

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**SEPARAÇÃO E HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE:  
ALTERNATIVAS PARA O REAPROVEITAMENTO DESTE RESÍDUO**

DANIELA PARREIRA MARQUES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA-  
UNESP, COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
CIÊNCIA DOS ALIMENTOS.

**ARARAQUARA/ SP**

**2005**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**SEPARAÇÃO E HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE:  
ALTERNATIVAS PARA O REAPROVEITAMENTO DESTE RESÍDUO**

DANIELA PARREIRA MARQUES

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA-  
UNESP, COMO PARTE DAS EXIGÊNCIAS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
CIÊNCIA DOS ALIMENTOS.

**ORIENTADOR: PROF. DR. RUBENS MONTI**

**ARARAQUARA/ SP**

**2005**

## **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Marques, Daniela Parreira

M357s      Separação e hidrólise das proteínas no soro de leite: alternativas para o reaproveitamento deste resíduo / Daniela Parreira Marques . – Araraquara, 2005.

81 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Rubens Monti

1.Soro de leite. 2.Separação de proteínas. 3.Hidrólise de proteínas I.  
Monti, Rubens, orient. .II. Título.

**CDD: 637.124028**

**CAPES:50700006**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rubens Monti  
(Orientador)

---

Prof. Dr. Reinaldo Marchetto  
(Membro)

---

Prof. Dra. Raquel de Lima C. Giordano  
(Membro)

---

Prof. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli  
(Membro)

---

Prof. Dr. Jonas Contiero  
(Membro)

À Deus pela sabedoria e serenidade nos  
momentos mais difíceis.

À minha mãe, gratidão pelos conselhos e cuidados.

Ao Rodrigo pelo apoio e incentivo para  
seguir em frente.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e conselheiro Prof Dr. Rubens Monti, pelo incentivo, paciência e, sobretudo, pela credibilidade apostada em meus potenciais.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Antônio J. Goulart, Olga L. Tavano, Vivian Menocci e Paulo R. Adalberto pela amizade, conhecimentos transmitidos e agradáveis momentos divididos.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pelo apoio, sugestões e incentivo.

Aos Profs Drs. Leonardo Cardello e Paulo R. M. Bonilha (*in memoriam*) pelos conselhos e ensinamentos que auxiliaram minha pesquisa.

Ao Prof Dr. Sinézio Inácio da Silva Jr. pelo auxílio e amizade.

À Roseli, Mara e Lica, técnicas em laboratório, que muito ajudaram na solução de problemas.

À Eliane (Instituto de química) pela ajuda na obtenção dos dados.

Às minhas queridas amigas Mirella e Jamila pela grande amizade conquistada e pelos conselhos em momentos difíceis.

Aos professores da Pós-Graduação que fizeram com que meus conhecimentos se aprimorassem e fossem aplicados.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma auxiliaram minha pesquisa e a conclusão desse trabalho  
OBRIGADA.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Revisão de Literatura.....</b>	<b>02</b>
<b>1.1.1 Composição do soro de leite.....</b>	<b>02</b>
<b>1.1.1.1 <math>\beta</math>- Lactoglobulina (<math>\beta</math>- Lg).....</b>	<b>02</b>
<b>1.1.1.2 <math>\alpha</math>- Lactoalbumina (<math>\alpha</math>- La).....</b>	<b>03</b>
<b>1.1.1.3 Soro Albumina Bovina (BSA).....</b>	<b>03</b>
<b>1.1.1.4 Imunoglobulinas.....</b>	<b>03</b>
<b>1.1.2 Enzimas proteolíticas.....</b>	<b>04</b>
<b>1.1.2.1 Alcalase.....</b>	<b>04</b>
<b>1.1.2.2 Tripsina.....</b>	<b>04</b>
<b>1.1.2.3 Carboxipeptidase.....</b>	<b>04</b>
<b>1.1.2.4 Quimotripsina.....</b>	<b>04</b>
<b>1.1.3 Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite.....</b>	<b>05</b>
<b>1.1.4 Separação das proteínas do soro.....</b>	<b>05</b>
<b>1.1.4.1 Cromatografia de troca iônica.....</b>	<b>05</b>
<b>1.1.4.2 Cromatografia de exclusão molecular.....</b>	<b>06</b>
<b>1.1.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</b>	<b>07</b>
<b>1.1.4.4 Eletroforese.....</b>	<b>07</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>08</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>08</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>08</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>09</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>09</b>
<b>3.1.1 Soro de leite.....</b>	<b>09</b>
<b>3.1.2 Enzimas.....</b>	<b>09</b>

3.1.3 Reagentes utilizados na dosagens de proteína, aminoácidos e peptídeos e açúcar redutor.....	09
3.1.3.1 Proteínas.....	09
3.1.3.2 Aminoácidos e peptídeos.....	09
3.1.3.3 Açúcar redutor.....	09
3.1.4 Filtração.....	09
3.1.5 Diálise.....	10
3.1.6 Resinas.....	10
3.1.7 Eletroforese.....	10
3.1.8 Equipamentos.....	10
3.2 Métodos.....	10
3.2.1 Preparo do soro.....	10
3.2.2 Métodos analíticos.....	11
3.2.2.1 Dosagem de proteína do soro.....	11
3.2.2.2 Dosagem de açúcar redutor do soro.....	12
3.2.3 Temperatura e pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase.....	12
3.2.4 Estudos cinéticos.....	13
3.2.5 Hidrólise enzimática.....	13
3.2.6 Caracterização dos hidrolisados.....	14
3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	15
3.2.7.1 Condições desnaturantes.....	15
3.2.7.2 Condições não desnaturantes (PAGE).....	16
3.2.8 Separação das proteínas do soro do leite.....	16
3.2.8.1 Cromatografia em coluna de DEAE- Trisacryl.....	16
3.2.8.2 Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G25.....	17
3.2.9.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	17
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
4.1 Dosagem de açúcar redutor e proteína do soro do leite.....	18
4.1.1 Dosagem de açúcar redutor.....	18
4.1.2 Dosagem de proteína.....	19
4.2 Temperatura e pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase.....	20
4.3 Parâmetros cinéticos.....	22
4.4 Quantificação do produto de reação liberado pelas proteinases.....	23

<b>4.5 Eletroforeses do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato.....</b>	<b>25</b>
<b>4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência.....</b>	<b>33</b>
<b>4.7 Separação das proteínas do soro.....</b>	<b>38</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6 ANEXO- TRABALHOS A SEREM PUBLICADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Curva de calibração de lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.....	18
<b>Figura 2.</b> Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.....	19
<b>Figura 3.</b> Temperatura ótima de hidrólise da enzima alcalase diluída 5 vezes incubada em pH 9,5 com soro de leite tratado como substrato.....	21
<b>Figura 4.</b> pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase diluída 5 vezes incubada a 55°C com soro de leite tratado como substrato.....	21
<b>Figura 5.</b> Gráfico de Transformação de Eadie- Hofstee para a hidrólise das proteínas do soro do leite por alcalase em T 50°Ce pH 9,0. ....	23
<b>Figura 7.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: soro de leite não hidrolisado; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 30 minutos de reação.....	26
<b>Figura 8.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina e alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: hidrolisado com alcalase e tripsina 60 minutos; coluna 3: hidrolisado com alcalase e tripsina após 1440 minutos; coluna 4: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 60 minutos; coluna 5: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 1440 minutos de reação.....	27
<b>Figura 9.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: enzima alcalase; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 20 minutos; coluna 7: 30 minutos de reação.....	28
<b>Figura 10.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3:10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos de reação.....	29
<b>Figura 11.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, quimotripsina e	

carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: Soro de leite não hidrolisado; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 10 minutos; coluna 5: 20 minutos; coluna 6: 30 minutos; coluna 7: 60 minutos de reação.....	30
<b>Figura 12.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos; coluna 7: 1440 minutos de reação.....	31
<b>Figura 13.</b> SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos; coluna 7: 1440 minutos de reação.....	32
<b>Figura 14.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e quimotripsina.....	33
<b>Figura 15.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase	34
<b>Figura 16.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e carboxipetidase.....	34
<b>Figura 17.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e tripsina.....	35
<b>Figura 18.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase.....	36
<b>Figura 19.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina.....	36
<b>Figura 20.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 120 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase adicionados nos tempos 0, 40 e 80 minutos de reação respectivamente.....	37
<b>Figura 21.</b> Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 120 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina adicionados nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos de reação respectivamente.....	38

- Figura 22.** Perfil de eluição das proteínas do soro: coluna de 1,4 x 23 cm empacotada com DEAE- Trisacryl. (●) Absorbância a 280nm; (-) gradiente de pH, NaCl e tampão..... 39
- Figura 23.** SDS-PAGE das frações eluídas da coluna cromatográfica de DEAE-Trisacryl. (1) Marcadores de massa molecular; (2) Fração I; (3) Fração II; (4) Fração III; (5) Fração IV; (6) Fração V; (7) Fração VI..... 40
- Figura 24.** Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G- 25 ( 2 x 73 cm) da fração V obtida da coluna de DEAE-Trisacryl. (●) Absorbância em  $\lambda$  280nm..... 41
- Figura 25.** PAGE 9 % pH 8,9 de soro de leite (A) e da fração obtida da coluna de Sephadex G-25 (B)..... 42

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Determinação da quantidade de açúcar redutor (lactose) no soro do leite.....	18
<b>Tabela 2.</b> Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento...	20
<b>Tabela 3.</b> Temperatura e pH ótimos de hidrólise e concentração ideal das enzimas tripsina e quimotripsina.....	22
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros cinéticos ( $K_m$ e $V_{máx}$ ) das enzimas tripsina e quimotripsina.....	23
<b>Tabela 5.</b> Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro de leite como substrato em pH 9,0 e temperatura 50°C.....	25

## RESUMO

A poluição ambiental, causada pela liberação de resíduos protéicos, vem sendo enfocada em todo o mundo, pois compromete a estrutura físico-química dos solos, polui as águas dos rios, mares e lagos, além de destruir a flora e fauna.

Em decorrência da grande quantidade de soro produzido no mundo anualmente (100 bilhões de litros) e da riqueza de nutrientes que este resíduo apresenta, iniciaram-se há algumas décadas atrás, testes para o aproveitamento desse resíduo. A hidrólise das proteínas do soro é apontada como o principal tratamento, mas além do processo de hidrólise o soro pode ter suas proteínas separadas e constituir dessa forma muitos outros subprodutos.

Tendo em vista as propriedades funcionais, físicas e químicas, e a grande quantidade de trabalhos que citam os hidrolisados e as proteínas do soro do leite como substâncias de alto valor biológico, pretende-se neste trabalho de Dissertação de Mestrado relatar estudos da hidrólise das proteínas do soro do leite por diferentes combinações com enzimas proteolíticas, e demonstrar um procedimento simples para separar as proteínas do soro, sem alterar a conformação nativa das mesmas, para que, posteriormente, possam ser utilizadas na produção de dietas enterais, sucos, sorvetes, suplementos esportivos, kit para determinação de massa molecular em laboratórios, dentre outros produtos. O soro do leite foi caracterizado e vários estudos de hidrólise (utilizando suas proteínas como substrato e alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina como enzimas) foram realizados. Paralelamente, realizaram-se estudos para a separação das proteínas do soro por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se uma coluna empacotada com DEAE-Trisacryl, combinando gradiente de força iônica e de pH na eluição, permitindo a separação parcial de soroalbumina bovina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina. Os resultados mostraram que a combinação enzimática mais eficaz na proteólise foi a realizada pelas quatro enzimas em conjunto (alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina). Uma melhora no grau de hidrólise, com conseqüente diminuição dos peptídeos observados na análise por CLAE, foi obtida quando as enzimas foram adicionadas na mesma seqüência, porém, uma a uma em tempos diferentes durante a reação de hidrólise. Os resultados da cromatografia por DEAE-Trisacryl mostraram que o procedimento de separação de proteínas proposto é um excelente método de separação, e tratamentos especiais não são necessários para obter este grau de eficiência. Após a separação, a  $\beta$ -lactoglobulina foi totalmente purificada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-25.

## ABSTRACT

The ambient pollution, caused for the release of proteid residues, has being focused in the whole world, therefore it compromises earth physicochemical structure, causes the water pollution of rivers, seas and lakes besides destroying fauna and flora.

In result of the great amount of milk serum produced in the world annually (100 billion liters) and of the wealth of nutrients that this residue presents, they had been initiated some decades behind, tests for the exploitation of this residue. Whey protein hydrolysis is pointed as the main treatment, but beyond the hydrolysis process the serum can have its proteins separated and constitute of this form many other by-products.

In view of the functional properties, physics and chemistries, and the great amount of works that cite the serum proteins hydrolysates of milk as substances of high biological value, it is intended in this work to tell studies of serum milk protein hydrolysis with different combinations with proteolytic enzymes, and demonstrate a simple procedure to separate the serum proteins, without modifying the native conformation of the same ones, so that, later, they can be used in the production of diets, juices, ices cream, sporting supplements and molecular makers production. Whey protein was characterized and some hydrolysis studies (using alcalase, trypsin, carboxypeptidase e chymotrypsin) had been carried. through. Parallel, studies for the separation of proteins for liquid high efficiency chromatography had been become fulfilled (CLAE) using a column packed with DEAE-Trisacryl, combining ionic force and pH. This studies allowed the partial separation of SBA,  $\beta$ -lactoglobulin e  $\alpha$ -lactalbumin. The results had shown that more efficient enzymatic combination was carried through for four enzymes in set (alcalase, trypsin, carboxypeptidase e chymotrypsin). An improvement in the hydrolysis degree, with consequent reduction of the peptides observed in the analysis for CLAE, was gotten when the enzymes had been added in the same sequence, however, one to one in different times during the hydrolysis reaction. DEAE- Trisacryl results indicated that the protein separation procedure proposed is an excellent method to separate and no special treatments are need to obtain this efficiency degree. After separation,  $\beta$ - lactoglobulin was totally purified by a Sephadex G25 column of molecular exclusion chromatography.

# *INTRODUÇÃO*

## 1 INTRODUÇÃO

O soro do leite é um subproduto de grande importância na indústria de laticínios, tendo em vista seu volume produzido e sua composição nutricional. Cerca de 55% dos nutrientes existentes no leite ficam retidos no soro durante a fabricação de queijos (Stanton et al., 2002). A fabricação de queijos produz cerca de 145 milhões de toneladas de soro ano. No Brasil, os queijos tiveram um consumo recorde nestes últimos cinco anos e, aliado a este aumento, está também a necessidade de criar alternativas para a utilização desse resíduo, principalmente pelos médios e pequenos laticínios. A minimização de impactos ambientais tornou-se preocupação de toda indústria de transformação em nível mundial, tornando o desenvolvimento de processos limpos de fundamental importância para assegurar a competitividade no mercado global e atender às leis de proteção ambiental.

O soro é um potente agente de poluição que pode provocar a destruição da flora e da fauna devido a sua alta demanda biológica de oxigênio (DBO) que é de cerca de 30.000 a 50.000mg de oxigênio por litro de soro. Este valor é aproximadamente 100 vezes maior do que o de um esgoto doméstico (Richards, 2000). Além dos problemas ambientais causados, o soro do leite ainda pode comprometer a estrutura físico-química do solo, diminuir os rendimentos das colheitas e reduzir a flora e fauna.

Uma das alternativas para resolver esse problema é a transformação dos resíduos protéicos em produtos comercializáveis. Com o auxílio de processos técnico modernos de separação e hidrólise, o soro de leite vem sendo transformado em produtos de amplas utilidades.

As aplicações de hidrolisados de proteína como fonte de aminoácidos livres e de pequenos peptídeos são inúmeras. Uma das aplicações mais importantes dos hidrolisados é sua utilização como fonte de nitrogênio na formulação de dietas enterais destinadas à alimentação infantil e de adultos enfermos (Guadix et al., 2000). Os componentes do soro do leite podem ainda ser utilizados na formulação de bebidas lácteas, leites fermentados, mistura para sucos, ricota, bebidas nutricionais e fortificadas, chocolates, sorvetes, suplementos esportivos, dentre outros produtos. Além de ser reaproveitado por hidrólise, o soro do leite pode sofrer um processo de separação de suas proteínas e constituir dessa forma muitos outros subprodutos como, por exemplo, marcadores de massa molecular, podendo ainda, ser aplicado na formulação de alimentos com propriedades funcionais (Ex: incorporação da  $\alpha$ -lactoalbumina que têm atividade opiácea ou incorporação de  $\beta$ -lactoglobulina que têm atividade antihipertensiva e opiácea em alimentos (Baró et al., 2001).

## 1.1 Revisão de Literatura

### 1.1.1 Composição do soro de leite

A composição do soro varia em função do queijo produzido, mas, em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida), sendo que, deste total, 71% é lactose, 10% proteína bruta (PB), 12% gordura e 11% sais minerais (Lizeire e Campos, 2000). É certo também, que o soro do leite é uma mistura variada de proteínas que contém uma larga classe de propriedades químicas, físicas e funcionais.

As proteínas do soro do leite são globulares e compactas (variam de 14 a 100 kDa) e são universalmente definidas como aquelas proteínas que permanecem no soro após a coagulação das caseínas em pH 4,6 a 20° C (Morr e Ha, 1993; Imafidon, 1997). As principais proteínas existentes no soro são:  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina, soro albumina bovina e imunoglobulinas. Além das proteínas citadas acima, o soro contém ainda proteínas menores e peptídeos como: fragmentos de  $\beta$ -caseína (proteose-peptona), resíduos de caseína coagulada, fragmentos de  $\kappa$ -caseína, peptídeos desconhecidos e micelas da caseína do leite. As duas proteínas de maior concentração e que representam o componente de maior valor agregado por kilo de soro são as lactoalbuminas e lactoglobulinas (Perea e Ugalde, 1996).

#### 1.1.1.1 $\beta$ -Lactoglobulina ( $\beta$ -Lg)

A  $\beta$ -lactoglobulina, quantitativamente, é a principal proteína do soro. No pH normal do leite (pH 6,68) ela é um dímero de massa molecular 36 kDa formada pela associação de duas subunidades globulares idênticas de massa molecular 18 kDa (Lourenço, 2000). Cada unidade possui estrutura primária constituída de 162 resíduos de aminoácidos em que estão presentes duas ligações dissulfeto intramoleculares que unem o resíduo de aminoácido 66 ao 160 e o resíduo 106 ao 121, e um grupo sulfidrilo reativo. A estrutura secundária da  $\beta$ -Lg parece ser formada por 15% de  $\alpha$ -hélice, 50% de folhas  $\beta$  e de 15% a 20% de voltas  $\beta$ . A  $\beta$ -Lg nativa é muito resistente à proteólise pela pepsina em pH 2,0 e o aquecimento entre 50 e 70° C não aumenta a porcentagem de hidrólise, mas o aquecimento da proteína a 90°C antes da hidrólise facilita a ação da pepsina. A  $\beta$ -Lg nativa e aquecida em pH 8,0 à temperatura entre 50 e 70° são hidrolisadas com eficácia pela quimotripsina.

Ensaio biológicos realizados com animais de várias espécies mostram que a  $\beta$ -Lg é resistente à digestão gástrica e, pode ser considerada o principal alérgeno do leite bovino e das fórmulas lácteas infantis.

### **1.1.1.2 $\alpha$ - Lactoalbumina ( $\alpha$ -La)**

A  $\alpha$ -lactoalbumina é a segunda principal proteína do soro. A família  $\alpha$ -La consiste em um componente quantitativo principal de massa molecular 12,3 kDa (a menor proteína do soro) e possivelmente outros componentes em pequenas quantidades. A proteína é formada por 123 resíduos de aminoácidos é rica em resíduos lisil, treonil, triptofanil e cisteinil, tem ponto isoelétrico em pH 5,1 e quatro ligações dissulfeto intramoleculares que unem os resíduos 6 e 120, 28 e 111, 61 e 77 e 73 e 91, os quais estabilizam sua conformação nativa ao tratamento (Lourenço, 2000). Os estudos de estrutura secundária dessa proteína sugerem uma molécula de conformação dobrada compacta com 26% de  $\alpha$ -hélice, 14% de conformação  $\beta$  e 60% em espiral ao acaso. Sua desnaturação ocorre em faixa ampla de temperatura (70 e 96°C).

### **1.1.1.3 Soro Albumina Bovina (SBA)**

A SBA tem conformação nativa globular solúvel em água, formada por uma cadeia polipeptídica constituída de aproximadamente 580 resíduos de aminoácidos de massa molecular 66,2 kDa, com pI em pH 4,7 a 4,8. Sua estrutura secundária contém cerca de 54% de  $\alpha$ -hélice e 40% de conformação- $\beta$  (folhas- $\beta$  e voltas- $\beta$ ) (Lourenço, 2000). Essa proteína tem um grupo sulfidrílico no segmento amino-terminal e 17 ligações dissulfeto intramoleculares que são inacessíveis à redução por agentes químicos porque, estão confinadas no interior da conformação nativa. Suas ligações dissulfeto são reduzidas apenas em meio contendo agentes desnaturantes (uréia ou hidrocloreto de guanidina). É resistente à desnaturação térmica a 60°C por tempos prolongados.

### **1.1.1.4 Imunoglobulinas**

Todas as imunoglobulinas são glicoproteínas monômeros ou polímeros de uma molécula de quatro subunidades das quais duas são leves de massas moleculares 20 kDa e duas são pesadas, de massas moleculares 50 a 70 kDa que se associam por meio de ligações dissulfeto e interações não covalentes.

Essas proteínas são divididas em quatro grupos designados IgA, IgE, IgG e IgM. Em cada molécula de um grupo ou subgrupo a estrutura primária das duas subunidades pesadas são idênticas e apresentam uma região constante de 310 a 500 resíduos de

aminoácidos e uma região variável de 107 a 115 resíduos. As imunoglobulinas do soro representam 0,7% a 2% da proteína total do leite. A IgG é o grupo principal e compreende 80% do conteúdo total dessas proteínas (Lourenço, 2000).

### **1.1.2 Enzimas Proteolíticas**

#### **1.1.2.1 Alcalase**

A alcalase é uma endoprotease do tipo serina produzida por uma cepa seleta de *Bacillus licheniformis* (Novo Nordisk (1994) apud Tardioli et al., 2003). Ela cliva primariamente ligações peptídicas onde o lado carboxílico contém resíduos hidrofóbicos como leucina, tirosina e valina (Adamson e Reynolds, 1996 e Kukman, Blatnik e Abram, 1995). Esta enzima possui larga especificidade na clivagem de ligações peptídicas existentes entre glicina e histidina; serina e histidina; leucina e tirosina e tirosina e triptofano. A temperatura e pH ótimos de hidrólise dessa enzima situam-se entre 50-70°C e 9,0-9,5 respectivamente.

#### **1.1.2.2 Tripsina**

A tripsina é uma endopeptidase que hidrolisa ligações peptídicas em que o resíduo do lado carbonil é arginina ou lisina. Este procedimento desenrola a proteína deixando os resíduos aromáticos e hidrofóbicos mais disponíveis (Whitaker (1966) apud Tardioli et al., 2003). A massa molecular dessa enzima é 24 kDa e seu pH ótimo situa-se entre 7,0 e 9,0.

#### **1.1.2.3 Carboxipeptidase**

A carboxipeptidase é uma exoprotease que rapidamente remove amino ácidos aromáticos da extremidade carboxil terminal (Ambler (1972) apud Tardioli et al., 2003). O pH e temperatura ótimas de hidrólise são respectivamente 7,5 e 25°C.

#### **1.1.2.4 Quimotripsina**

A quimotripsina é uma endoprotease que cliva oligopeptídeos quando o aminoácido carboxílico é resíduo hidrofóbico como os aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), leucina, isoleucina e outros. O pH ótimo dessa enzima situa-se entre 7,5 e 8,5.

### **1.1.3 Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite**

Diversos artigos apontam à hidrólise das proteínas do soro do leite como um possível processo para o reaproveitamento do resíduo (Monti e Jost, 1978; Monti e Jost, 1982; Guadix et al., 2000 e Galvão et al., 2001).

As aplicações de hidrolisados de proteína como fonte de aminoácidos livres e de pequenos peptídeos são inúmeras. Além de servir para a produção de subprodutos do soro, a hidrólise das proteínas pode ser efetuada por uma variedade de razões entre elas, para melhorar as características nutricionais, retardar a deterioração, dar textura, aumentar ou diminuir a solubilidade, adicionar propriedades espumantes ou de coagulação, melhorar a capacidade de emulsificação (Stanton et al., 2002).

É um processo suave que ocorre em uma série de estágios e, como não é feita em paralelo com reações de degradação de outros componentes do meio, permite o controle da funcionalidade do produto final através da especificidade das enzimas utilizadas (Monti e Jost, 1978).

Dado a importância, do ponto de vista econômico, do processo de hidrólise para as indústrias produtoras do resíduo e, devido à observação das diferentes aplicações dos subprodutos do soro, esforços para o desenvolvimento de estudos nessa área são necessários para o aprimoramento, simplificação e diminuição dos custos do processo.

### **1.1.4 Separação das proteínas do soro**

#### **1.1.4.1 Cromatografia de Troca iônica**

Na cromatografia de troca iônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem a este tipo de cromatografia. A separação dos materiais por cromatografia de troca iônica está baseada na adsorção reversível e diferencial de íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido à diferença de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e a força iônica. A matriz de um trocador apresenta ligações covalentes a grupos trocadores iônicos (aniônicos e

catiônicos) e é constituída de um material poroso de origem inorgânica ou orgânica, natural ou sintético (inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos). O conhecimento da seletividade de um trocador é muito importante para o seu emprego. Em resumo, o trocador iônico prefere:

1. íons com alta carga
2. íons de pequeno tamanho (solvatados)
3. íons altamente polarizáveis
4. íons com fracas interações com a fase móvel

A eluição da coluna pode ser efetuada utilizando-se o próprio tampão no preparo da coluna. Neste caso a separação é mais lenta do que aquela em que há troca de tampão. Outra possibilidade de eluição de uma coluna cromatográfica é por mudanças em fases discretas de pH ou de força iônica, ou ainda, de uma combinação desses fatores. A mudança de pH do tampão eluente, em direção ao ponto isoelétrico de uma substância amostra, causa a diminuição da carga líquida, sendo mais facilmente desadsorvida e eluída do trocador. Abaixando-se a força iônica a competição pelos grupos carregados do trocador torna-se mínima e as substâncias são fortemente ligadas à ele. Tanto o pH quanto a força iônica, podem ser variados de uma maneira contínua e constante com o uso de gradientes. A forma do gradiente também varia em função do volume de tampão eluente utilizado. Neste trabalho utilizou-se uma coluna de 1,4 x 24 cm de DEAE- Trisacryl (Sigma) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 5 mM em pH 6,8 para a separação das proteínas do soro do leite

#### **1.1.4.2 Cromatografia de exclusão molecular**

A cromatografia com gel de filtração separa proteínas, peptídeos e oligonucleotídeos pelo tamanho. As moléculas movem-se através de uma resina porosa passando entre os poros da resina ou por fora da mesma dependendo de seu tamanho. As moléculas menores passam por entre os poros levando, portanto, um tempo maior para percorrer toda a coluna enquanto as moléculas maiores entram menos ou simplesmente passam por fora dos poros movendo-se mais rapidamente. Tanto a massa molecular quanto a conformação tridimensional contribuem para o grau de retenção. Neste caso a escolha do gel apropriado é imprescindível para o sucesso na separação da proteína que se quer estudar. Neste trabalho utilizou-se uma coluna de 2 x 73 cm contendo gel Sephadex G25 para a filtração da proteína separada por DEAE-Trisacryl.

### 1.1.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE é uma técnica cromatográfica que tem um líquido como fase móvel e fases estacionárias que podem ser líquidas ou sólidas, sendo estas mais comumente utilizadas. Emprega alta pressão na separação dos componentes da amostra e por isso, é capaz de completar a análise em alguns minutos além de promover adsorção de líquidos em partículas extremamente pequenas e uniformes para promover alta sensibilidade. O equipamento utilizado na CLAE é caro e sofisticado, pois é resultado da aplicação de alta pressão, necessária para operar colunas extremamente eficientes, recheadas com partículas de diâmetro muito pequeno, a uma velocidade de fluxo de poucos mL/min.

### 1.1.4.4 Eletroforese

Uma molécula com carga elétrica líquida mover-se á em um campo elétrico. Esta é a denominação de ELETROFORESE.

As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, pois, o mesmo suprime correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura. As moléculas que são menores em relação aos poros movem-se facilmente no gel, ao passo que as moléculas maiores que os poros são quase imóveis.

Os géis de poliacrilamida são meios de sustentação escolhidos para eletroforeses porque são quimicamente inertes, sendo formados prontamente pela polimerização da acrilamida. O tamanho de seus poros pode ser controlado pela escolha de concentrações variáveis de acrilamida e de bisacrilamida no momento da polimerização.

As proteínas podem ser bem separadas, em função de sua massa, pela eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A mistura de proteínas é primeiro dissolvida em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico que rompe quase todas as interações não covalentes das proteínas nativas. Adiciona-se também o beta-mercaptoetanol ( $\beta$ ME), para reduzir as pontes dissulfeto. Os complexos de SDS com proteínas desnaturadas são então submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na posição vertical. A eletroforese é encaminhada em direção ao pólo positivo. Proteínas com massas diferindo em cerca de 2% podem ser geralmente distinguidas. Neste trabalho realizou-se várias eletroforeses seguindo o método de Laemmli (1970), utilizando-se acrilamida a 12% e corrente de 40mA como suporte.

# OBJETIVOS

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Preparar o soro do leite com coalho comercial, e realizar estudos de separação e de hidrólise das proteínas com a enzima alcalase e, combinações com tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) e condições ótimas de pH e temperatura para a enzima alcalase;
- Realizar eletroforeses em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes do hidrolisado e das proteínas separadas por DEAE-Trisacryl e, em condições não desnaturantes das proteínas purificadas filtradas por gel Sephadex G 25.
- Analisar os produtos de reação de hidrólise por cromatografia líquida de alta eficiência e compará-los com os perfis eletroforéticos das SDS-PAGEs e com os produtos de reação liberado pelas proteinases obtidos pelo método de McDonald e Chen (1965).

# MATERIAL E MÉTODOS

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Soro de leite**

O soro de leite foi produzido em laboratório a partir do leite C (Cooperativa de Laticínios São Carlos) e renina comercial de *Aspergillus niger* da marca Estrela.

##### **3.1.2 Enzimas**

A alcalase produzida por *B. licheniformis* foi adquirida comercialmente (Merk). Quimotripsina, Tripsina e Carboxipeptidase foram adquiridas comercialmente, sendo a primeira da Sigma e as demais da Novo Nordisk.

##### **3.1.3 Reagentes utilizados nas dosagens de proteínas, aminoácidos e peptídeos e açúcar redutor**

###### **3.1.3.1 Proteínas**

Para a dosagem de proteínas foram utilizados os seguintes reagentes:

Sulfato de cobre, tartarato de sódio-potássio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio (Merck), Folin-Ciocalteu e soro albumina bovina (Sigma, Chemical Co., EUA).

###### **3.1.3.2 Aminoácidos e peptídeos**

Ácido tricloroacético, sulfato de cobre, tartarato de sódio- potássio, carbonato de sódio e hidróxido de sódio (Merck), Folin-Ciocalteu e tirosina (Sigma, Chemical Co., EUA).

###### **3.1.3.3 Açúcar redutor**

Para a dosagem de açúcar redutor foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido 3-5´dinitrosalicílico(DNS) (Sigma) e lactose (Riedel).

##### **3.1.4 Filtração**

O caulim utilizado neste trabalho foi da marca Reagen.

### 3.1.5 Diálise

As membranas utilizadas para dialisar o soro foram doadas pela Trip- Fort (Hoester).

### 3.1.6 Resinas

As resinas utilizadas para a cromatografia de troca iônica e de separação foram respectivamente DEAE-Trysacril e Sephadex G -25, ambas da Sigma Chemical Co., EUA.

### 3.1.7 Eletroforese

Para a realização da eletroforese utilizou-se: Glicina, SDS, Temed, Comassie Brilliant Blue (Sigma, Chemical Co.) Tris-HCl (Vetec); Acrilamida, bisacrilamida e persulfato de amônio (Merck); Metanol, e ácido acético (Synth) e kit com marcadores de massa molecular (Amersham Biociences GE).

### 3.1.8 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: Centrífuga refrigerada (Eppendorf) Centrífuga analítica (Fanem Excelsa Baby II Modelo 206-R); Banho Maria, com agitação e aquecimento Dubnoff (Marconi); pHmetro (Micronal B-374); Espectrofotômetro (Utrospec 1000) e Coletor de Frações LKB- FRAC-200 (Amersham Biociences GE); Bomba de Vácuo adaptada pelo Cemeq-Unesp; Cuba para eletroforese em acrílico com eletrodos adaptados (Sigma); Fonte de eletroforese 0-500 volts e de 0-250 mA (Amersham Biociences GE) e Cromatógrafo (Varian ProStar), composto por duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/ Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, controlado por uma Workstation para manipulação e tratamento dos dados.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparo do Soro

O soro láctico foi preparado a partir de leite C e enzima renina (coalho comercial), na proporção de 50 mL de leite para 0,3 mL de coalho. Para a precipitação total das caseínas, foi adicionado 0.5% de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mol L<sup>-1</sup>. A temperatura do banho maria foi

ajustada em 35°C e assim permaneceu até o final da precipitação (aproximadamente uma hora). Após a coagulação, a massa foi cortada e dessorada através de processo de filtração simples com gaze. O soro obtido foi dialisado durante 24 horas sob agitação constante, contra água destilada, para a retirada da lactose. Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulin, na proporção de 0.6g de caulin para cada 30 mL de soro, e então foi realizada a filtração em funil de Büchner provido de papel de filtro (Custódio, 2001). O soro dialisado e filtrado foi armazenado em frascos identificados, e congelado até o momento dos ensaios.

### **3.2.2. Métodos analíticos**

#### **3.2.2.1. Dosagem de proteína do soro**

O método de Lowry modificado por Hartree (1972) foi utilizado na dosagem das proteínas do soro do leite. Este método baseia-se na complexação de íons  $\text{Cu}^{2+}$  com a proteína em meio alcalino (assim como na reação de Biureto), e na redução do ácido fosfomolibdico-tungstato. É um método bastante sensível, com sensibilidade entre 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  e utiliza como reagentes as seguintes soluções:

##### Solução A:

- carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1N

##### Solução B:

- tartarato de sódio e potássio 1% em água destilada

##### Solução C:

- sulfato de cobre 1% em água destilada

No momento do uso, as soluções foram misturadas na proporção de 50 mL de solução A; 0,5 mL de B e 0,5 mL de C.

Para a dosagem das proteínas do soro, foram realizadas diluições do soro em água destilada, para um volume final de 0,5 mL. A estas diluições foram adicionados 2,5 mL da mistura das soluções A, B e C citadas acima. As misturas resultantes foram fortemente agitadas e mantidas em repouso por quinze minutos, sendo adicionadas então, de 0,25 mL de Folin- Ciocalteau 1N e sofrendo nova agitação. Após trinta minutos, foram realizadas leituras a 660 nm. Para a determinação quantitativa foi utilizada curva de calibração com soro albumina bovina (Sigma) como padrão.

### 3.2.2.2 Dosagem de açúcar redutor do soro

A determinação de açúcar redutor (lactose) no soro do leite, foi realizada utilizando-se o método do ácido 3-5'-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). A efetuação das dosagens partiu de diluições do soro em água destilada para um volume final de 0,25 mL, seguida da adição de 0,25 mL do reagente DNS. Essa mistura foi aquecida em banho fervente por cinco minutos. Após o resfriamento (aproximadamente 3 minutos) à temperatura ambiente, foram adicionados mais 2,5 mL de água destilada à mistura, que foi agitada vigorosamente para homogeneização da cor. A leitura foi feita a 540 nm. A curva de calibração foi realizada com lactose (Riedel) como padrão.

O reagente DNS foi preparado da seguinte maneira:

#### Solução A:

- 10g de DNS em 200mL de água destilada. Misturar e agitar sob aquecimento a 37°C, por vinte minutos.

#### Solução B:

- 300g de tartarato de sódio- potássico em 300 mL de hidróxido de sódio 2 mol/L.

Misturar e agitar sob aquecimento a 37°C, durante vinte minutos. A solução A é então adicionada a B suavemente, para evitar a precipitação do ácido, e estocada em frasco âmbar. A solução mostra-se estável por um prazo máximo de 6 meses.

### 3.2.3 Temperatura e pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase

Primeiramente foram determinados concentração, temperatura e pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase. A concentração da enzima alcalase a ser utilizada foi obtida após ensaios realizados com 30 ml de soro (tamponado pH 9,0, 50°C) e enzima alcalase concentrada; diluída 5 vezes e diluída 2,5 vezes em água mili-Q. A temperatura ótima foi determinada com a incubação de 10 mL de soro de leite tratado, contendo 243 µL de tampão Carbonato-Bicarbonato (pH 9,5) e, 12,5µL da enzima alcalase diluída 5 vezes em água mili-Q a diversas temperaturas. O pH ótimo dessa enzima foi determinado após a incubação de 10 mL de soro e 12,5 µL de enzima diluída 5 vezes a 55°C, com vários sistemas tampões: tampão padrão McIlvaine, com variação de pH de 2,0 a 8,0; tampão fosfato de Sørensen, com variação de pH de 5,7 a 8,0 e tampão glicina- hidróxido de sódio, com variação de pH de 8,6 a 10,6.

### 3.2.4 Estudos cinéticos

A atividade da alcalase foi determinada utilizando-se proteínas do soro do leite como substrato, pela quantificação do produto formado (aminoácidos e peptídeos pelo método de McDonald e Chen, 1965). Os valores das constantes  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foram calculados a partir das taxas de velocidades iniciais utilizando a transformação de Eadie- Hofstee. O ajuste foi feito através de regressão linear utilizando o Software Origin 5.0.

### 3.2.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise das proteínas do soro foi realizada inicialmente em seis ensaios em pH 9,0 a 50°C com a alcalase diluída 5 vezes e as seguintes combinações enzimáticas: 1º ensaio: 30 ml de soro, 0,5 ml tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase e 2 mL de tripsina; 2º ensaio: 30 mL de soro, 0,5 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase, 2 mL de tripsina e 2 mL de carboxipeptidase; 3º ensaio: 30 ml de soro, 0,6 ml tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase e 2 mL de quimotripsina; 4º ensaio: 30 mL de soro, 0,5 mL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase, 2 mL de quimotripsina e 2 mL de carboxipeptidase; 5º ensaio: 30 ml de soro, 0,55 ml tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase e 2 mL de carboxipeptidase; 6º ensaio: 30 ml de soro, 0,55 ml tampão carbonato- bicarbonato pH 9,0, 37,5 µL de alcalase e 2 mL de tripsina, 2 mL de carboxipeptidase e 2 mL de quimotripsina. As enzimas foram adicionadas nos seis ensaios no tempo zero de reação. As misturas foram mantidas sob agitação constante. Alíquotas de 100 µL em triplicata foram retiradas em diversos intervalos de tempo para a realização de: dosagem de aminoácidos e peptídeos e eletroforeses. As amostras retiradas nos últimos tempos de reação foram fervidas por 3 minutos e armazenadas para posterior análise por CLAE.

Num segundo momento, com objetivo de otimizar a força proteolítica das enzimas, realizaram-se dois ensaios (alcalase, tripsina e carboxipeptidase e, alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina). A alcalase foi a única enzima adicionada no tempo zero de reação. A tripsina foi adicionada ao ensaio com três combinações enzimáticas após 40 minutos de reação e ao ensaio com quatro combinações enzimáticas após 30 minutos de reação. A carboxipeptidase foi adicionada aos ensaios de três e quatro combinações enzimáticas nos tempos 80 e 60 minutos respectivamente, e a quimotripsina foi adicionada somente ao ensaio com quatro combinações enzimáticas após 90 minutos de reação. Amostras

dos dois ensaios realizados neste segundo momento foram retiradas no tempo 120 minutos de reação e fervidas para a análise em CLAE.

### 3.2.6 Caracterização dos hidrolisados

Para estimar o produto de reação liberado pelas proteinases, foi utilizado o método de McDonald e Chen (1965). Este método permite estimar baixos níveis de peptídeos e aminoácidos formados na reação. As alíquotas retiradas em diversos intervalos de tempo de reação foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10% da solução final (V/V). Após serem mantidas por 12 horas sob refrigeração a 4°C, as misturas foram centrifugadas a 4000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com cuidado dos tubos e transferido para Eppendorfs identificados.

À 100µL da solução assim obtida, diluída com 400µL de água, foi adicionado 2,5 ml de uma mistura recém preparada, conforme descrita abaixo.

#### Solução A:

- 2 % de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>

#### Solução B:

- 10% de solução de hidróxido de sódio em água destilada

#### Solução C:

- 1% de sulfato de cobre em água destilada

#### Solução D:

- 2,7% de tartarato de sódio e potássio em água destilada

A mistura foi preparada na hora do uso na proporção de: 20 mL de solução A; 2,0 mL de solução B; 0,2 mL de solução C e 0,2 mL de solução D.

As soluções obtidas, após a adição da mistura, foram mantidas em repouso por dez minutos para adição de 0,25 mL do reagente Folin 1 N, para o desenvolvimento da cor. Segundo McDonald, a mistura do produto de hidrólise (aminoácidos e peptídeos) adicionada dos reagentes de Lowry, deve ter um pH próximo a 10.0 para favorecer o desenvolvimento da cor. As leituras de absorbância foram realizadas a 700 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando-se tirosina da Riedel-de-Haën como padrão.

### 3.2.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida

#### 3.2.7.1 Condições desnaturantes

As amostras para as eletroforeses foram preparadas adicionando-se a 150  $\mu\text{L}$  de tampão de ruptura 500  $\mu\text{L}$  das alíquotas de diversos intervalos de tempo.

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando-se acrilamida a 12% conforme solução descrita abaixo. O tempo de corrida foi de 3 a 4 horas em 40 mA. O volume aplicado de cada uma das amostras obtidas pelos ensaios foi de 25  $\mu\text{L}$  de alíquotas de cada tempo e 10  $\mu\text{L}$  de padrão. A polimerização da acrilamida se inicia com a adição de persulfato de amônio, e é acelerada pela adição de temed. O composto utilizado para efetuar a dissociação é o detergente iônico SDS. A amostra é desnaturada por aquecimento a cerca de 100°C, durante três minutos, na presença de excesso de SDS e de reagente sulfidrílico ( $\beta$ -mercaptoetanol).

#### SDS-PAGE

##### Tampão de separação:

Tris-----1,5M

SDS-----0,4%

pH-----8,8

(Diluir o Tris em água, ajustar o pH e adicionar o SDS)

##### Solução de acrilamida

Acrilamida-----30g(30%)

Bisacrilamida-----0,8g

Água destilada-----100mL

##### Solução de persulfato de amônio

$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  -----10%

Preparar na hora do uso

##### Tampão de concentração

Tris-----0,5M

SDS-----0,4%

pH----- 6,8

Diluir o Tris em água, ajustar o pH e adicionar o SDS.

### Solução Bisacrilamida

Bisacrilamida ----- 2%

A coloração do gel foi feita com Brilliant Blue G-Coloidal através do método de Neuhoff, 1988. Utilizou-se como padrão um kit de massa molecular da Amersham Biosciences GE, constituído de fosforilase b (97 kDa); soro albumina bovina (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

#### **3.2.7.2 Condições não desnaturantes (PAGE)**

A PAGE foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Davis (1964) em pH 8,9, durante 1 a 2 horas, utilizando-se gel a 9%, tampão Tris-HCl e corrente de 4mA por tubo (0.5 X 8cm). Foi aplicado a cada um dos tubos 50  $\mu$ L de cada amostra. O indicador de corrida empregado foi o azul de bromofenol (ABF) (Morr, 1978 e Havea et al., 1998). Após a eletroforese, os géis foram revelados com Comassie Blue R 250 (Sigma) (método modificado por Bautista, 2003). A PAGE foi realizada apenas para amostras do soro do leite concentrado e amostra do pico de proteína  $\beta$ -Lg purificada através de cromatografia em DEAE-Trisacryl e exclusão molecular em gel de Sephadex G-25.

#### **3.2.8 Separação das proteínas do soro do leite**

##### **3.2.8.1 Cromatografia em coluna de DEAE - Trisacryl**

O soro do leite dialisado e filtrado foi fracionado utilizando-se uma coluna (1,4 x 24 cm) DEAE-Trisacryl (Sigma) previamente equilibrada utilizando-se tampão fosfato de sódio 5 mM em pH 6,8. A eluição foi realizada com a adição 30 mL de soro a um fluxo de 27 mL/h, com frações de 2,2 mL coletadas em FRAC-200 (Amersham Biosciences GE), combinando-se gradientes de 5 a 200 mM do mesmo tampão, 0 a 100mM de NaCl e pH 6,8 a pH 5,6. A concentração protéica das frações foi determinada pela absorbância a 280nm em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences GE). Após a obtenção dos dados por espectrofotometria construiu-se um gráfico no programa Origin 5.0 para análise dos picos protéicos e separação das proteínas.

### 3.2.8.2 Cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-25

Após a separação das proteínas por DEAE-Trisacryl e obtenção do perfil de eluição em construção gráfica e observação do cromatograma eletroforético correspondente de cada pico obtido, escolheu-se o pico 5, para purificação até homogeneidade. A filtração foi realizada em uma coluna (2 x 73 cm) contendo gel Sephadex G-25. A essa coluna foram aplicados 2 mL da amostra inicialmente separada pela coluna de DEAE-Trisacryl. O gotejamento foi de 30mL/h a 24°C. As frações de 2,2mL foram coletadas (LKB Frac- 200, Amersham Biociences GE) e analisadas através de PAGE. A eluição da proteína foi analisada a 280nm. O gráfico correspondente a principal fração protéica separada foi construído através do programa Origin 5.0.

### 3.2.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras retiradas dos últimos tempos dos ensaios enzimáticos realizados no primeiro e segundo momentos foram fervidas por 3 minutos e congeladas para a posterior aplicação em CLAE. Alíquotas de 20µL foram injetadas. A coluna de separação utilizada foi a Nucleosil C<sub>18</sub> FR (25 x 0,4 cm),  $\Phi = 5\mu\text{m}$ , 300Å de porosidade, com um gradiente linear de 5 -95% de solvente B (A= 0,045 de TFA em água e B= 0,036% de TFD em Acetonitrila) em 20 minutos, com fluxo de 1,5 mL /min e detecção a 220 nm.

Os dados gerados pela workstation foram tratados no Origin 5.0 para a obtenção dos gráficos.

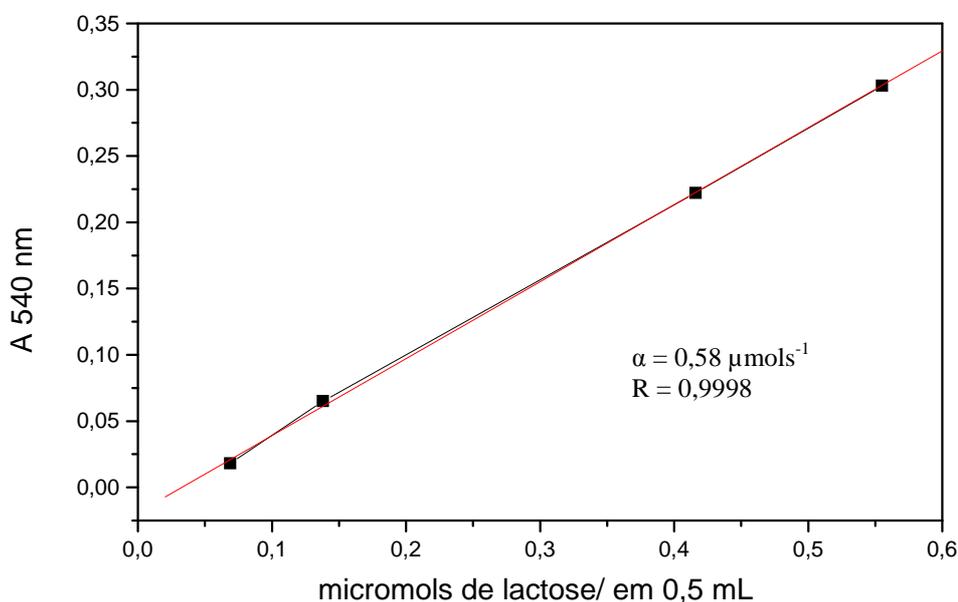
# *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dosagem de açúcar redutor e proteína do soro do leite

#### 4.1.1 Dosagem de açúcar redutor

Para a dosagem de açúcar redutor utilizou-se o método de Miller, (1959) como descrito no item 3.2.2.2. A curva de calibração utilizada, para posterior determinação da concentração de açúcar redutor no soro do leite, foi de lactose como apresentada na Figura 1. Foi determinado um coeficiente de extinção molar para a lactose, a partir da curva, igual a  $0,58\mu\text{mols}^{-1}$ . A Tabela 1. apresenta os valores obtidos nas dosagens.



**Figura 1.** Curva de calibração de lactose para determinação de açúcar redutor no soro do leite.

**Tabela 1.** Determinação da quantidade (média de dosagens) de açúcar redutor (lactose) no soro do leite

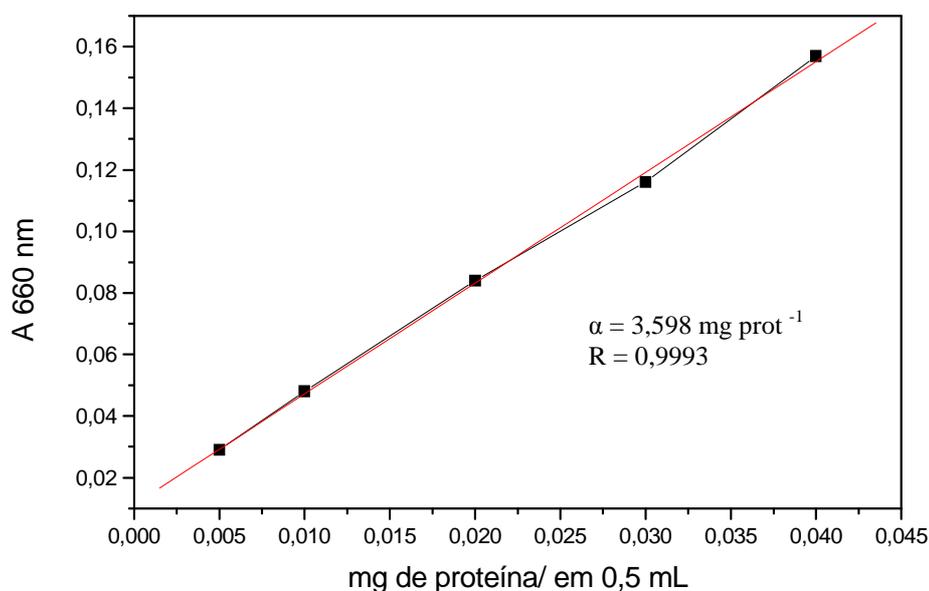
Amostras de soro	g/L	Diferença em % em relação à literatura
Soro produzido em laboratório puro (sem tratamento)	36,8	- 25,34 %
Soro Industrial sem tratamento*	49,29	= 100%
Soro produzido em laboratório (dialisado)	2,86	
Soro produzido em laboratório (dialisado e filtrado)	1,28	

\* Morr e Ha, 1993.

Nota-se pela Tabela 1 que o valor obtido para açúcar redutor, no soro de leite puro produzido no laboratório, isto é sem tratamento, está diferente (25,34% menor) do que o valor encontrado na literatura. Esta diferença pode ser devida a fatores como: tipo de leite utilizado; raça do animal; estágio de lactação ou tipo de tratamento sofrido pelo leite, por exemplo. Ainda de acordo com a Tabela 1 pode-se notar que após tratamentos de diálise e filtração os valores encontrados de açúcar redutor foram bem inferiores; o que significa, que os processos de tratamento realizados auxiliaram na retirada de açúcar redutor que é um interferente no método de dosagem de proteínas.

#### 4.1.2 Dosagem de proteína

O método de dosagem de proteínas utilizado neste trabalho, para estimar o conteúdo protéico do soro do leite produzido em laboratório nas várias etapas de processamento (soro puro, soro dialisado e soro dialisado e filtrado), foi o método Lowry modificado por Hartree (1972) como descrito no item 3.2.2.1. A Figura 2 mostra a curva de calibração de SBA utilizada para os cálculos da concentração de proteína. Determinou-se de acordo com a curva o valor de  $3,598 \text{ mg prot}^{-1}$  para o coeficiente de extinção.



**Figura 2.** Curva de calibração de SBA para determinação de proteínas no soro do leite.

A tabela 2 demonstra os resultados obtidos com as dosagens de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

**Tabela 2.** Determinação de proteína no soro do leite nas três etapas de processamento.

Amostras de soro	g/L	Diferença em % em relação à literatura
Soro produzido em laboratório (puro)	14,71	+ 139 %
Soro produzido em laboratório (dialisado)	6,99	+ 13,66%
Soro produzido em laboratório (dialisado e filtrado)	6,18	+ 0,48%
Soro Industrial*	6,15	= 100%

\* de acordo com Morr e Ha, 1993.

A partir da Tabela 2 pode-se notar diferenças existentes entre as dosagens de proteínas que ocorreram no soro puro e nos soros dialisado, dialisado e filtrado.

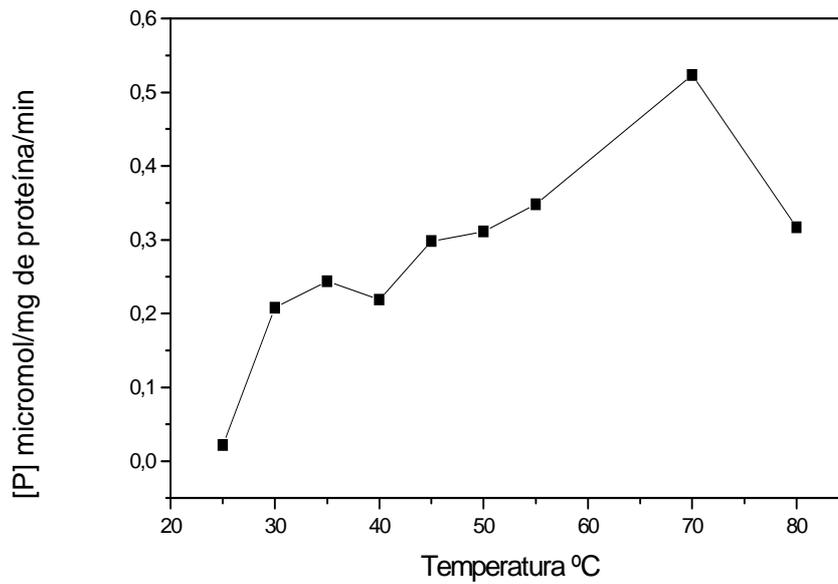
De acordo com Peterson (1979) e Hartree (1972) a lactose presente no soro do leite interfere na análise pelo método de Lowry. A lactose sendo um açúcar redutor reduz o cobre presente na solução de dosagem de proteína provocando com isto, um aumento na coloração e consequentemente valores superestimados de proteína.

Como visto no item anterior (4.1.1) o açúcar redutor foi diminuído após a realização dos tratamentos de diálise e filtração do soro, colaborando dessa forma para a dosagem real da quantidade de proteínas no soro tratado. Além disso, o processo de filtração em caulin promoveu a retirada de prováveis micelas de caseína não precipitadas que também poderiam causar alterações no resultado da dosagem de proteínas.

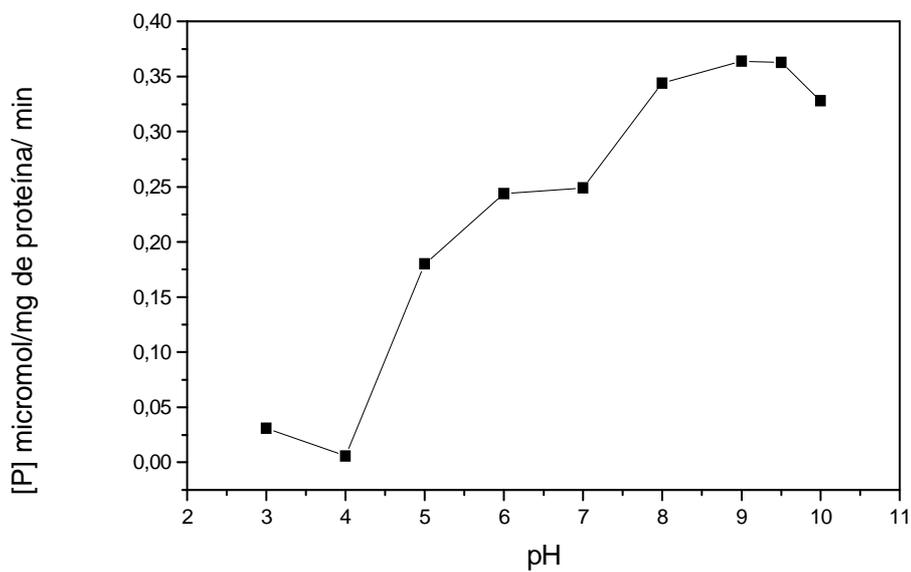
De acordo com o resultado da dosagem de proteínas obtido para o soro tratado, pode-se constatar que os métodos de tratamento foram eficientes, pois, os valores determinados nas dosagens do soro produzido são coincidentes aos encontrados na literatura.

#### **4.2 Temperatura e pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase**

Diferentes concentrações da alcalase foram ensaiadas utilizando soro de leite tratado como substrato. Após vários experimentos realizados determinou-se que a concentração ideal de enzima para obtenção da linearidade nas velocidades de reação foi de 37,5 µL de enzima alcalase diluída 5 vezes para 30 mL de substrato. A temperatura e o pH ótimo de hidrólise (Figuras. 3 e 4) obtidos foram 70° C e 9,0- 9,5 respectivamente.



**Figura 3.** Temperatura ótima de hidrólise da enzima alcalase diluída 5 vezes incubada em pH 9,5 utilizando soro de leite tratado como substrato.



**Figura 4.** Efeito do pH na hidrólise da enzima alcalase diluída 5 vezes incubada a 55°C utilizando soro de leite tratado como substrato.

A Tabela 3 mostra os valores encontrados na literatura (Custódio, 2001) para temperatura e pH ótimos de hidrólise e concentração ideal das enzimas tripsina e quimotripsina.

**Tabela 3.** Temperatura e pH ótimos de hidrólise e concentração ideal das enzimas tripsina e quimotripsina.

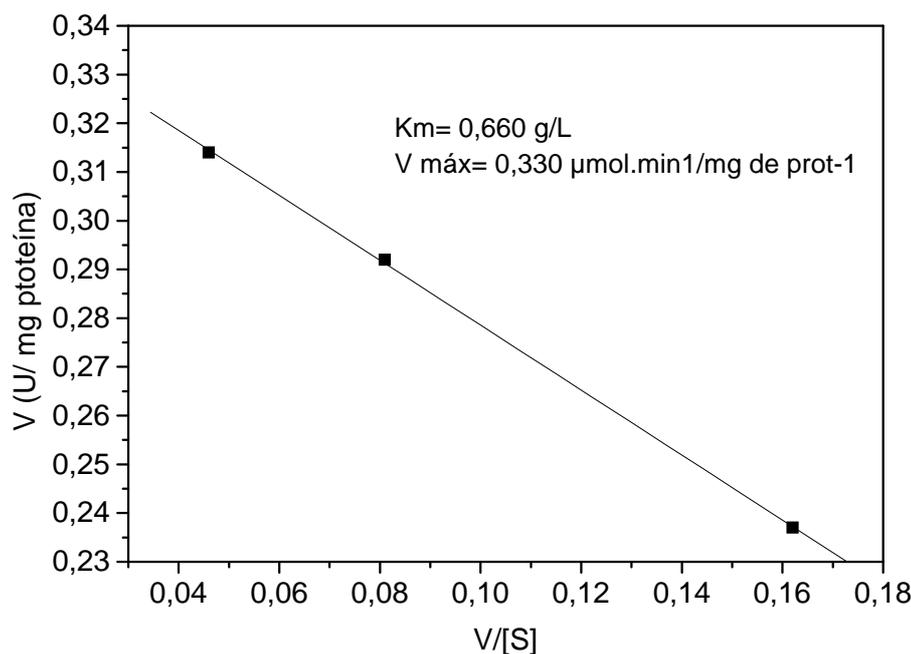
Enzima	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Concentração ideal (mg/mL)
Tripsina	60	9,0	0,5 mg/mL
Quimotripsina	50	9,0	0,5 mg/mL

Fonte: Custódio, 2001

Após comparar os dados de temperatura e pH ótimos de hidrólise da Tabela 3 com os dados obtidos para a enzima alcalase, decidiu-se que os ensaios enzimáticos deveriam ser realizados em pH 9,0 e a temperatura de 50°C pois no mesmo ensaio, seriam adicionadas várias enzimas. Esta temperatura e pH definidos pelos estudos comparativos, foram adotados para evitar a desnaturação ou diminuição da atividade das enzimas envolvidas favorecendo assim, a hidrólise das proteínas do soro do leite.

#### 4.3 Parâmetros cinéticos

K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> da enzima alcalase foram obtidos através da determinação das velocidades iniciais em diferentes concentrações de substrato e utilizando a representação gráfica de Eadie- Hofstee (Figura 5). Determinou-se os valores de 0,66 g/L e 0,33  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg de prot}^{-1}$  para K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> respectivamente. Os resultados mostram que trata-se de uma enzima Michaelina que possui boa afinidade pelo substrato. Os parâmetros cinéticos da tripsina e quimotripsina são apresentados a seguir (Tabela 4) de acordo com Custódio, 2001 e também demonstram boa afinidade das enzimas pelo substrato. Ao comparar os valores de K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> obtidos para a enzima alcalase com os valores obtidos por Custódio (2001) para as enzimas tripsina e quimotripsina, pode-se concluir que o K<sub>m</sub> da alcalase é 3,62 vezes menor que o da tripsina e 6,37 vezes menor que o da quimotripsina e o V<sub>máx</sub> da enzima alcalase é 1,43 vezes maior que o da tripsina e 1,46 vezes maior que o da quimotripsina. Os dados de eficiência catalítica também demonstrados na tabela 4 permitem concluir que a alcalase possui maior eficiência na hidrólise das proteínas do soro do leite do que as demais enzimas também



**Figura 5.** Gráfico de transformação de Eadie- Hofstee para a hidrólise das proteínas do soro do leite por alcalase em T° 50°C e em pH 9,0.

**Tabela 4.** Parâmetros cinéticos (Km e Vmáx) e eficiência catalítica das enzimas tripsina, quimotripsina e alcalase .

Enzima	Km (g/L)	Vmáx ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg prot}^{-1}$ )	Eficiência catalítica
Tripsina*	2,388	0,231	0,096
Quimotripsina*	4,203	0,226	0,053
Alcalase	0,660	0,330	0,500

\* Custódio, 2001

#### 4.4 Quantificação do produto de reação liberado pelas proteinases

Observa-se na Tabela 5, que nos seis ensaios realizados inicialmente, a quantidade em unidades totais de aminoácidos, aumentou quando comparados os resultados dos tempos 30 e 60 e, 60 e 1440 minutos de reação. Estes valores permitem concluir que há um aumento de hidrólise das proteínas do soro com o passar do tempo na maioria das amostras, com exceção das amostras 6 e 7 que apresentaram valores iguais nas dosagens de tempo 60 e 1440 minutos. Provavelmente nestes ensaios aos 60 minutos de reação dois fatores podem estar ocorrendo:

todas as proteínas já estão hidrolisadas ou, poderá estar ocorrendo uma possível proteólise das enzimas envolvidas no ensaio impossibilitando uma maior hidrólise das proteínas do soro do leite.

A comparação dos ensaios 1 e 2 permitem concluir que a alcalase, por ser uma enzima comercial não tão específica como a tripsina, promove uma hidrólise superior quando adicionada em separado ao ensaio. Uma hipótese levantada para um menor produto de hidrólise no ensaio 2 pode ser devido à tripsina estar hidrolisando a alcalase, diminuindo sua atividade. Já, ao comparar as amostras 2 e 3 pode-se concluir que a carboxipeptidase exerce pouca atividade no ensaio pois, os valores encontrados com ou sem a adição de carboxipeptidase são semelhantes para as unidades totais em aminoácidos em ambos os ensaios. Comparando os experimentos 4 e 5, pode-se concluir que a inserção de quimotripsina aos ensaios promoveu um excelente grau de hidrólise em ambos os casos e que a carboxipeptidase utilizada no experimento 5, assim como no 3, não promoveu melhora significativa na hidrólise das proteínas do soro do leite.

Os ensaios 6 e 7, permitem concluir que a adição das quatro enzimas em conjunto não favorece o aumento na hidrólise das proteínas do soro do leite. Uma explicação para este fato se deve à hipótese de proteólise das enzimas envolvidas no ensaio promovida pela alcalase uma serina não específica.

Novos ensaios enzimáticos poderão ser realizados com a adição das enzimas em tempos diferentes de reação em seus pHs e T<sup>o</sup>s ótimas de hidrólise sendo que a cada adição enzimática e decorrido certo tempo de hidrólise a enzima em questão é inativada, o substrato é tamponado novamente e a temperatura ajustada para a adição de uma próxima enzima. Este processo provavelmente evitará a proteólise enzimática.

Posteriormente os valores encontrados e demonstrados na Tabela 5 serão comparados com as análises eletroforéticas e análises em CLAE para a conclusão dos resultados de hidrólise.

**Tabela 5.** Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro de leite como substrato em pH 9,0 e temperatura 50°C

Ensaio	U totais de aa em 30 min	U totais de aa em 60 min	U totais de aa em 1440 min
1. Soro e alcalase (diluída 5x)	nd.	3,81	nd.
2. Soro, alcalase e tripsina	nd.	1,62	3,49
3. Soro, alcalase, tripsina e carboxipeptidase	nd.	1,39	4,01
4. Soro, alcalase e quimotripsina	6,16	8,74	nd.
5. Soro, alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase	5,66	8,09	nd.
6. Soro, alcalase e carboxipeptidase	nd.	6,68	6,68
7. Soro, alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina	nd.	6,17	6,17

Legenda: nd= não dosados

#### 4.5 Eletroforeses do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzimas e soro de leite como substrato

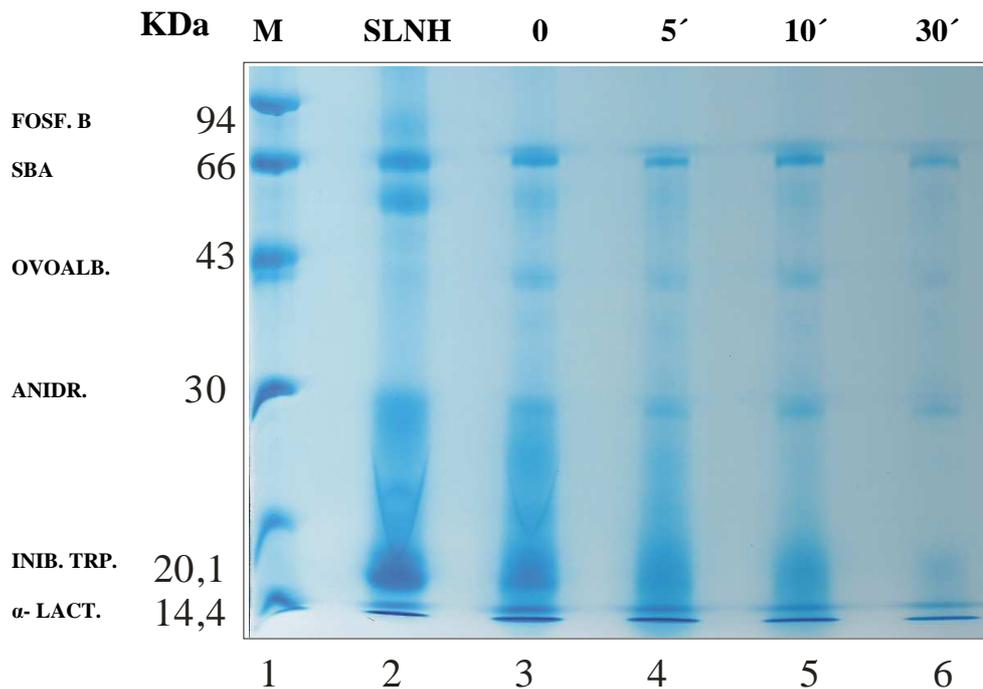
A análise eletroforética em SDS-PAGE do produto de hidrólise do ensaio com alcalase e tripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro de leite como substrato (Figura 7) revelou que nas amostras retiradas no tempo zero (coluna 3) todas as proteínas do soro estão presentes, entretanto, nos tempos 10 e 30 minutos (colunas 5 e 6) observa-se que há uma diminuição das proteínas presentes no soro do leite.

Análise eletroforética do produto de hidrólise dos ensaios da alcalase e tripsina e da alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro de leite como substrato (Figura 8), revelou que amostras retiradas dos ensaios com alcalase mais tripsina aos 60 minutos de reação (coluna 2) apresentam as proteínas  $\alpha$ -La e SBA, não hidrolisadas totalmente, enquanto que aos 1440 minutos (coluna 3), as proteínas SBA e  $\beta$ -Lg foram totalmente hidrolisadas, sobrando pequena fração de  $\alpha$ -La sem ser hidrolisada.

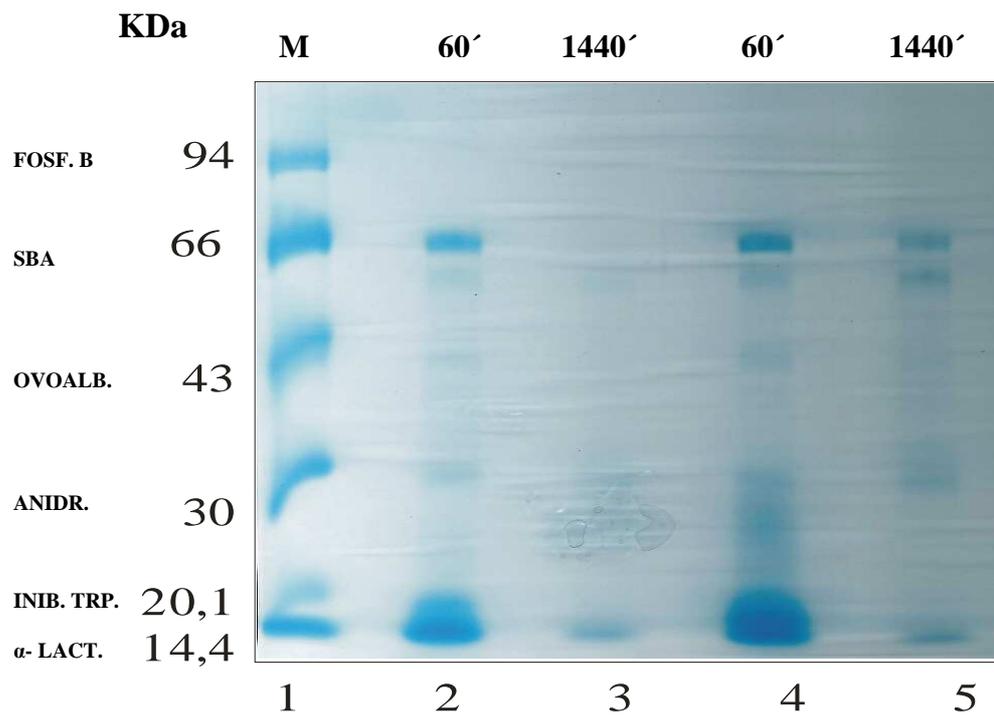
Na mesma Figura 8 foram analisados também produtos de hidrólise da ação de três enzimas proteolíticas concomitantemente. Neste tipo de experimento verificou-se que não houve hidrólise maior do que quando se utilizou apenas 2 enzimas. Aos 60 minutos (coluna 4)

as proteínas SBA,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La não foram hidrolisadas, e aos 1440 minutos (coluna 5) a SBA,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La foram hidrolisadas parcialmente.

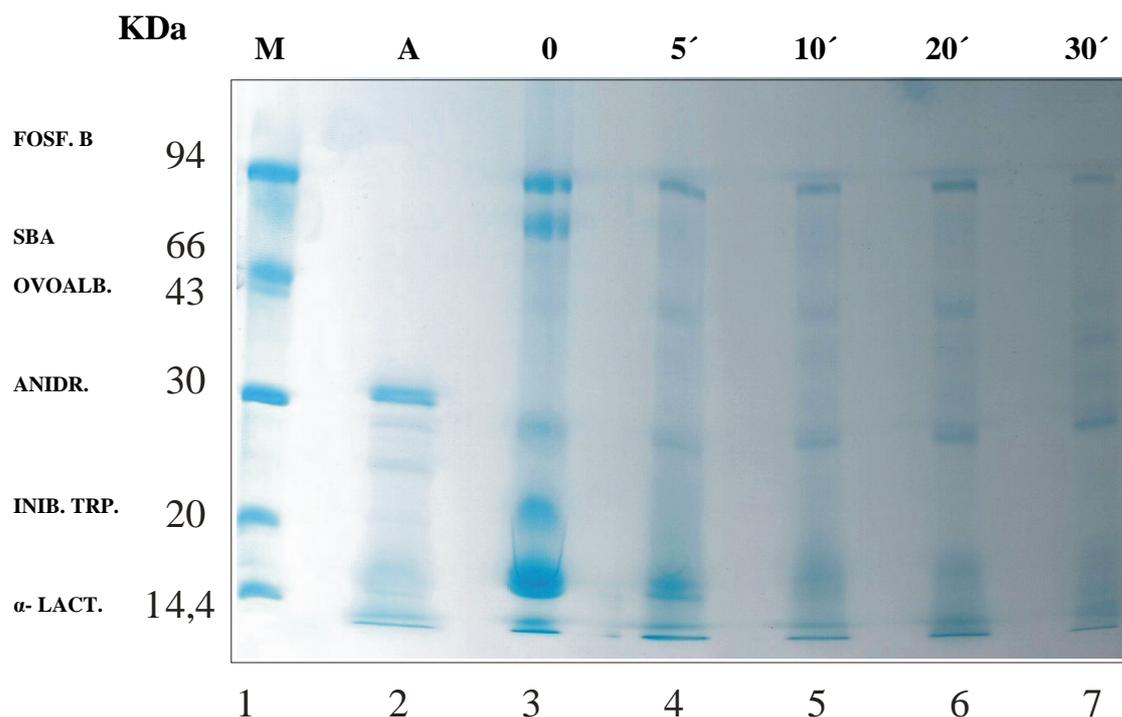
A análise eletroforética do produto de hidrólise do ensaio da alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando o soro do leite como substrato (Figura 9) revela que com esta combinação de enzimas após 30 minutos de reação ocorreu hidrólise total da  $\beta$ -Lg e, diminuição drástica da SBA e  $\alpha$ -La.



**Figura 7.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: soro de leite não hidrolisado; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 30 minutos de reação.

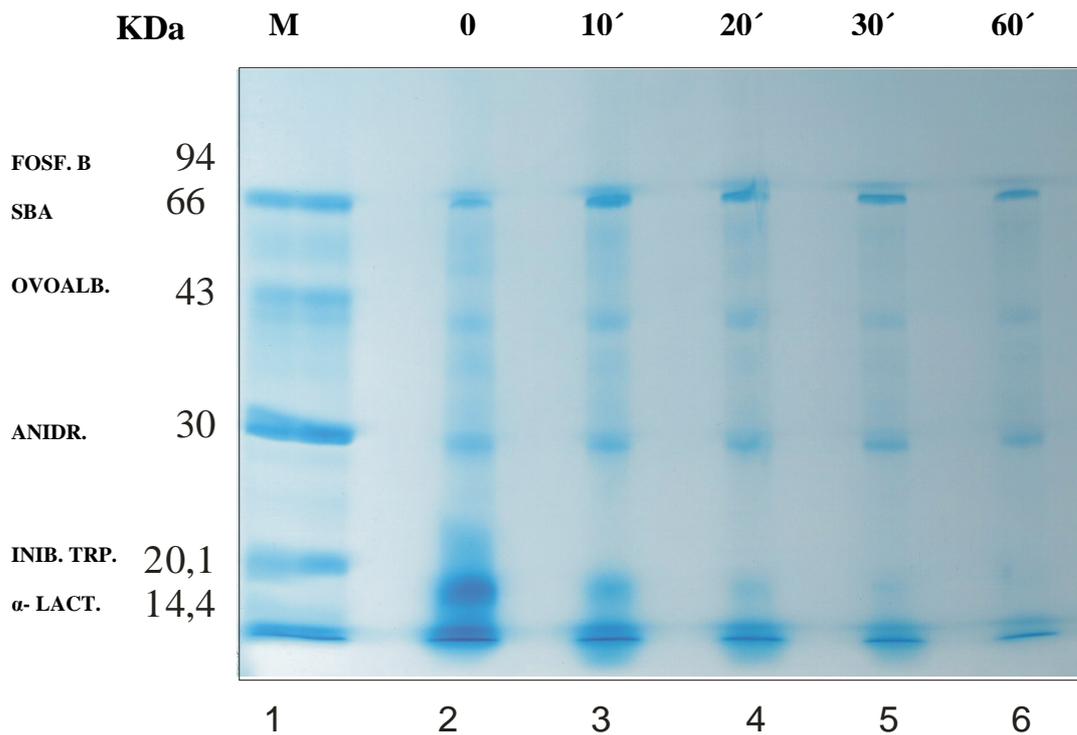


**Figura 8.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina e alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: hidrolisado com alcalase e tripsina 60 minutos; coluna 3: hidrolisado com alcalase e tripsina após 1440 minutos; coluna 4: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 60 minutos; coluna 5: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 1440 minutos de reação.



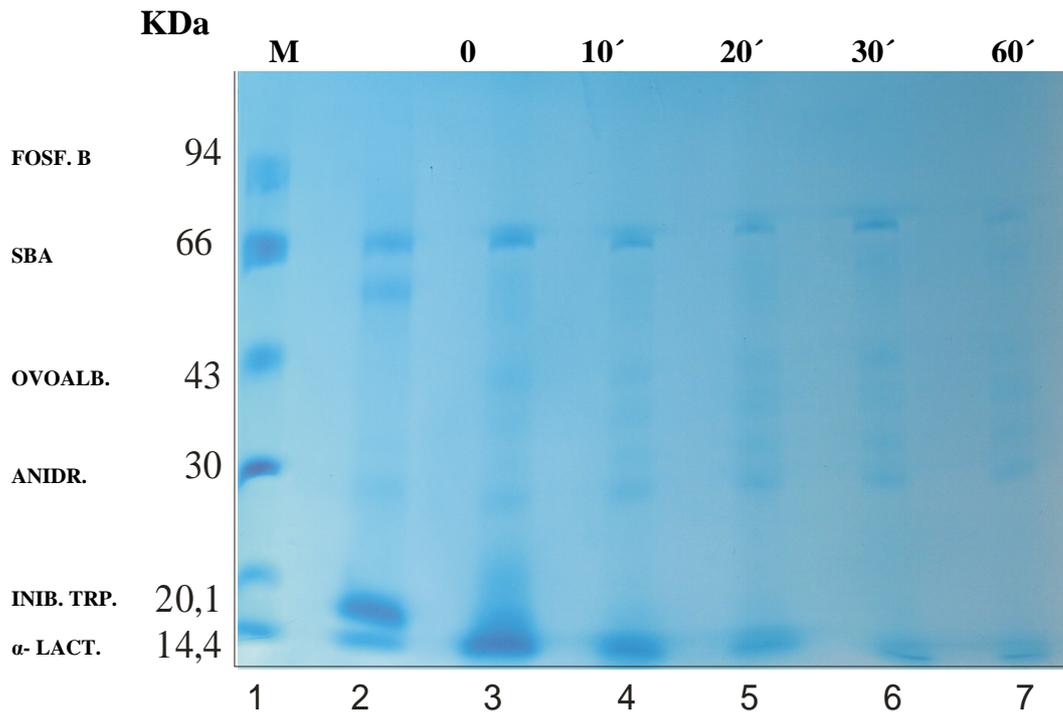
**Figura 9.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: enzima alcalase; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 20 minutos; coluna 7: 30 minutos de reação.

A análise eletroforética do produto de hidrólise do ensaio da alcalase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando o soro do leite como substrato (Figura 10) revelou que após 30 e 60 minutos de reação (colunas 5 e 6) ocorreu hidrólise total da  $\beta$ -Lg, hidrólise quase total da  $\alpha$ -La e hidrólise parcial da SBA.



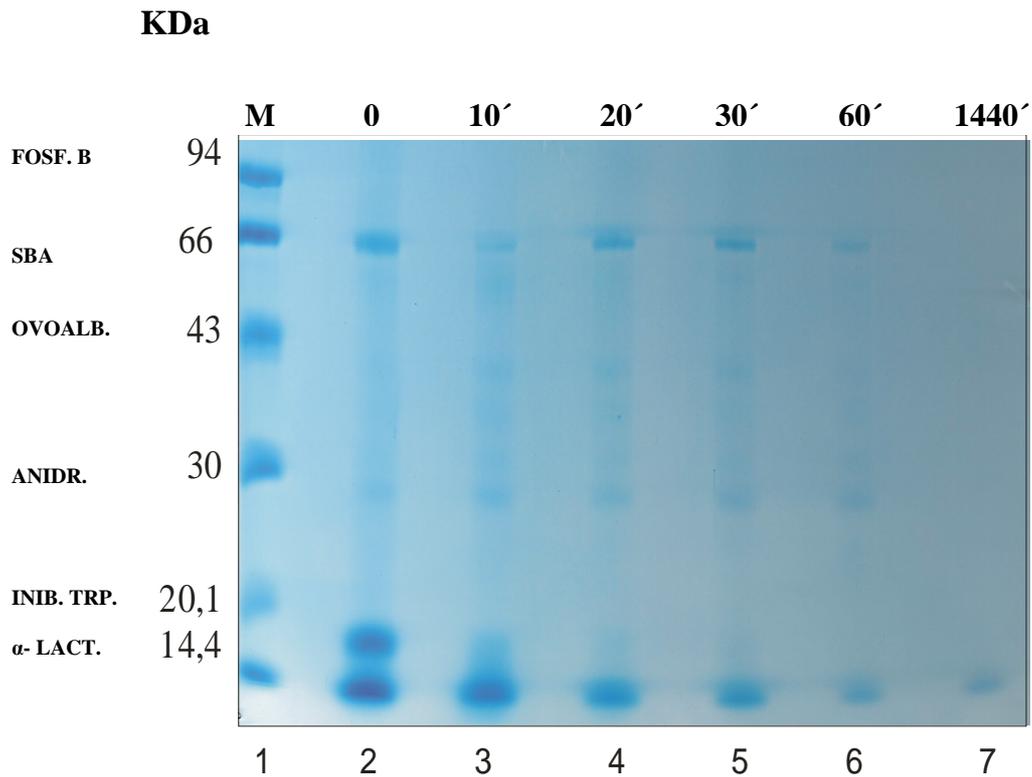
**Figura 10.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3:10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos de reação.

A análise eletroforética do produto de hidrólise do ensaio da alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando o soro do leite como substrato (Figura 11) revelou que esta combinação enzimática permitiu no tempo de 30 minutos de reação (coluna 6) a hidrólise total de  $\beta$ -Lg e de grande parte da  $\alpha$ -La e a redução quase total da SBA. No tempo de 60 minutos (coluna 7) a SBA e  $\alpha$ -La encontram-se quase totalmente hidrolisadas permanecendo em frações quase imperceptíveis.



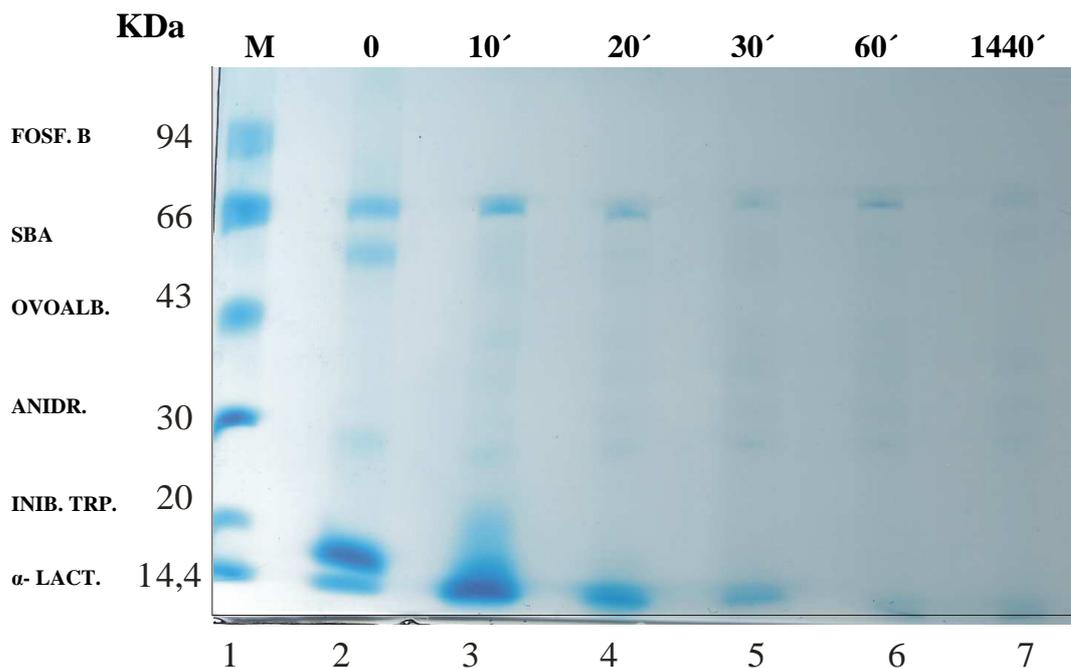
**Figura 11.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: Soro de leite não hidrolisado; coluna 3: tempo zero; coluna 4:10 minutos; coluna 5: 20 minutos; coluna 6: 30 minutos; coluna 7: 60 minutos de reação.

A análise eletroforética do produto de hidrólise da combinação enzimática alcalase e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando o soro do leite como substrato (Figura 12) demonstrou que no tempo 60 minutos de reação (coluna 6) restavam ainda a serem hidrolisadas pequenas frações de SBA e  $\alpha$ -La. No tempo de 1440 minutos (coluna 7) a  $\alpha$ -La diminuiu pouco em relação ao tempo de 60 minutos e a SBA foi hidrolisada totalmente.



**Figura 12.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos; coluna 7: 1440 minutos de reação.

Em estudos semelhantes utilizando agora o conjunto de quatro enzimas proteolíticas: alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina (Figura 13) ficou demonstrado que a hidrólise total das proteínas do soro do leite ocorre aos 1440 minutos de reação (coluna 7).



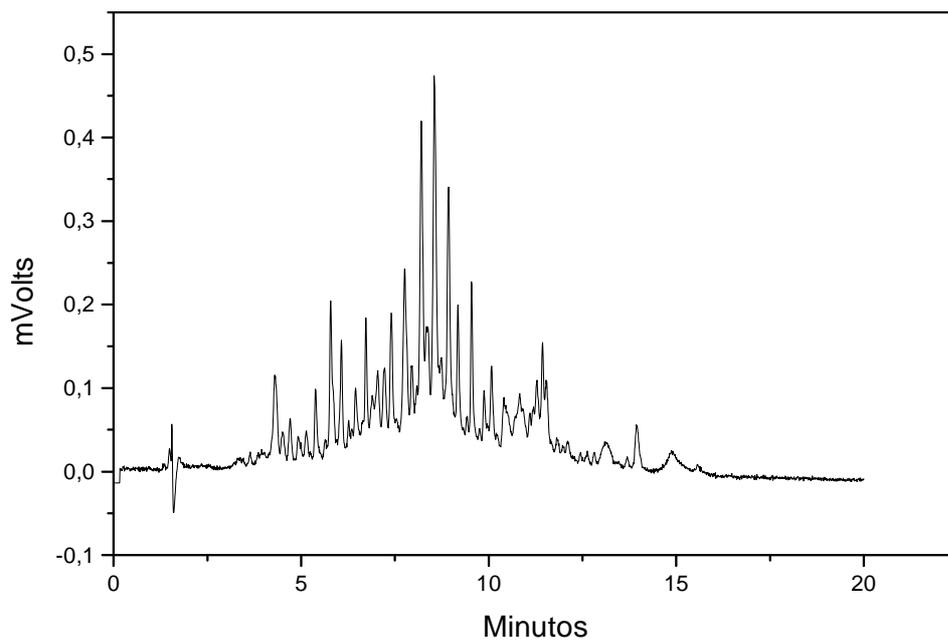
**Figura 13.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 10 minutos; coluna 4: 20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos; coluna 7: 1440 minutos de reação.

Os resultados obtidos com as eletroforeses revelam que o tempo do ensaio enzimático e as diferentes combinações enzimáticas determinam as proteínas a serem hidrolisadas e o grau de hidrólise. A combinação enzimática que permitiu uma maior hidrólise das proteínas do soro do leite foi a realizada pelas quatro enzimas em conjunto (alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina).

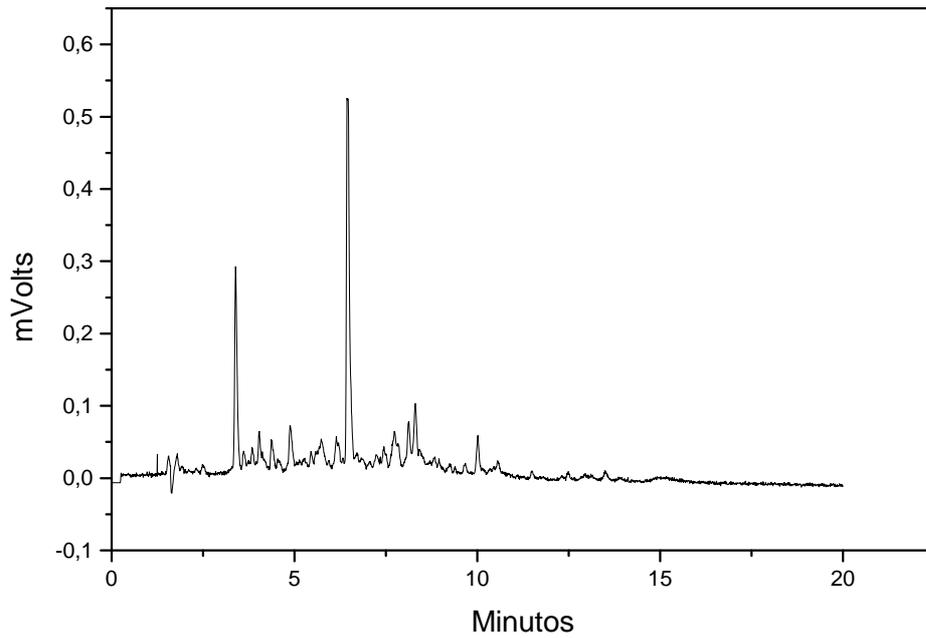
Pode-se notar ao comparar as análises eletroforéticas com os resultados obtidos pela quantificação do produto de reação liberado pelas proteinases, que nem sempre um valor maior obtido pela quantificação, é característica de um grau de hidrólise superior das proteínas do soro do leite. Como exemplo, pode-se ver que, no caso das quatro combinações enzimáticas o valor de proteína obtido pela quantificação do produto da hidrólise em unidades totais é menor, apesar de sua análise eletroforética apresentar todas as proteínas hidrolisadas, do que o valor da quantificação obtida no ensaio da alcalase e carboxipeptidase que ainda apresenta no tempo de 1440 minutos, pequena porção de  $\alpha$ -La.

#### 4.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

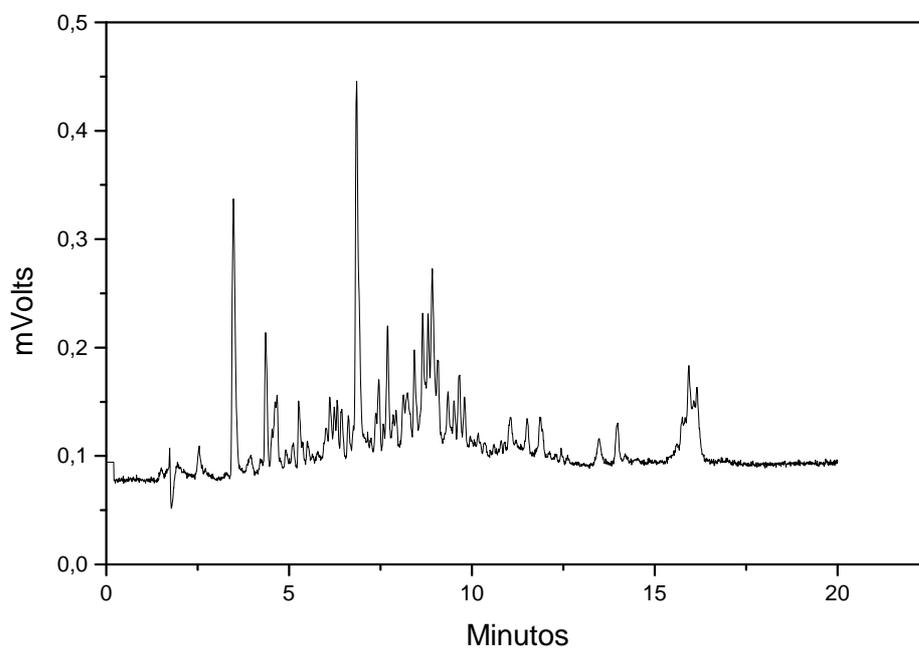
A cromatografia líquida de alta eficiência das amostras dos produtos de hidrólise do soro de leite dos ensaios realizados com: alcalase e quimotripsina (60 minutos) (Figura 14) alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase (60 minutos) (Figura 15); alcalase e carboxipeptidase (60 minutos) (Figura 16) revelou a presença de peptídeos (demonstrada pelos picos de absorção existentes na análise), confirmando os resultados mostrados através das eletroforeses de que há hidrólise das proteínas. As análises representadas pelas Figuras 14 e 16 apresentam uma maior quantidade de picos, que determinam maior quantidade de peptídeos existentes nessas amostras, quando comparadas à amostra representada pela Figura 15. Da mesma maneira, ao observar as análises eletroforéticas correspondentes a essas três análises pode-se concluir que o ensaio realizado com a alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase foi o que apresentou maior hidrólise protéica.



**Figura 14.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e quimotripsina.



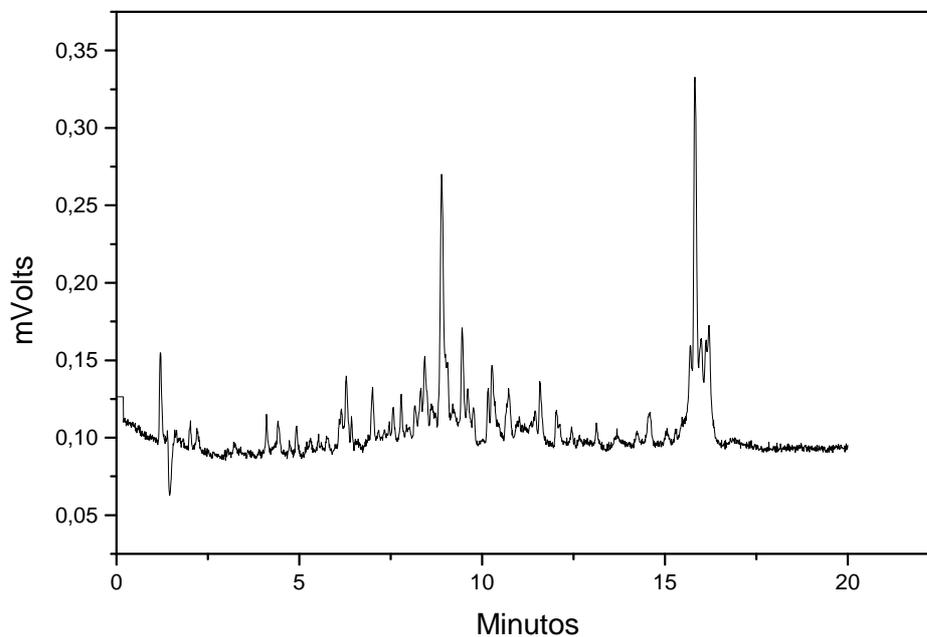
**Figura 15.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, quimotripsina e carboxipeptidase.



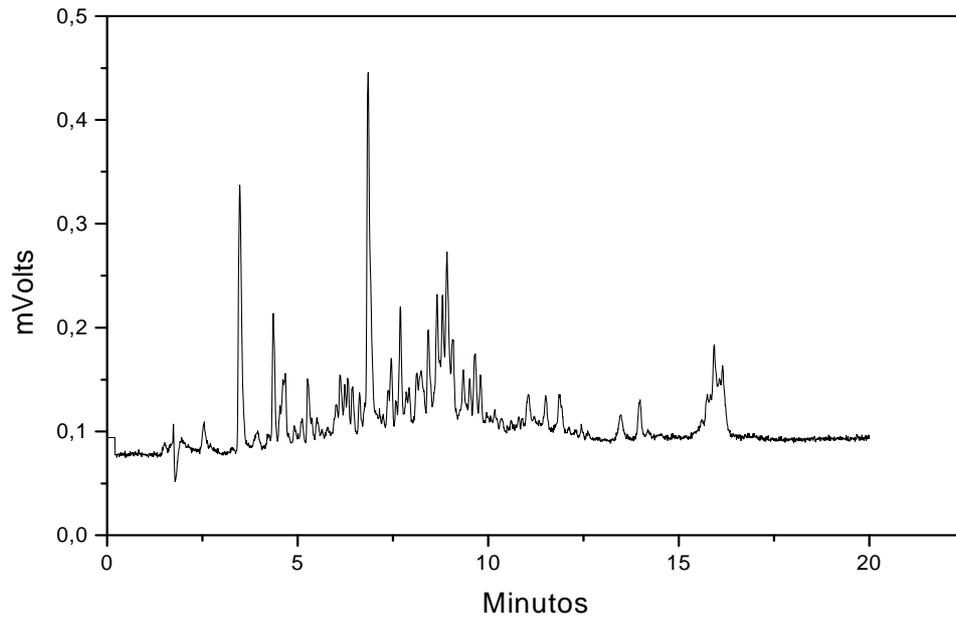
**Figura 16.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 60 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e carboxipeptidase.

A cromatografia líquida de alta eficiência de amostras dos produtos de hidrólise do soro de leite (1440 minutos) hidrolisadas por: alcalase e tripsina (Figura 17); alcalase, tripsina e carboxipeptidase (Figura 18) e alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina (Figura 19) com as diferentes combinações proteolíticas (Figuras 8, 9 e 10) revelaram a presença de peptídeos assim como nas análises relacionadas e discutidas anteriormente.

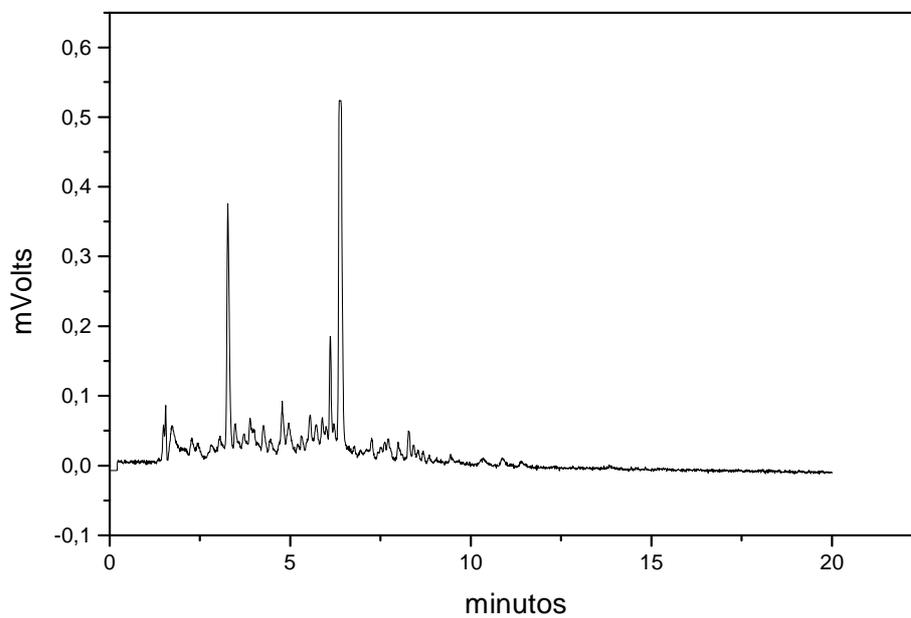
Os resultados apresentados na Figura 19 revelaram menor quantidade de peptídeos concordando com os resultados da maior hidrólise das proteínas verificados na SDS-PAGE (Figura 13) onde houve a combinação das quatro enzimas proteolíticas em estudo.



**Figura 17.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase e tripsina.



**Figura 18.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase.

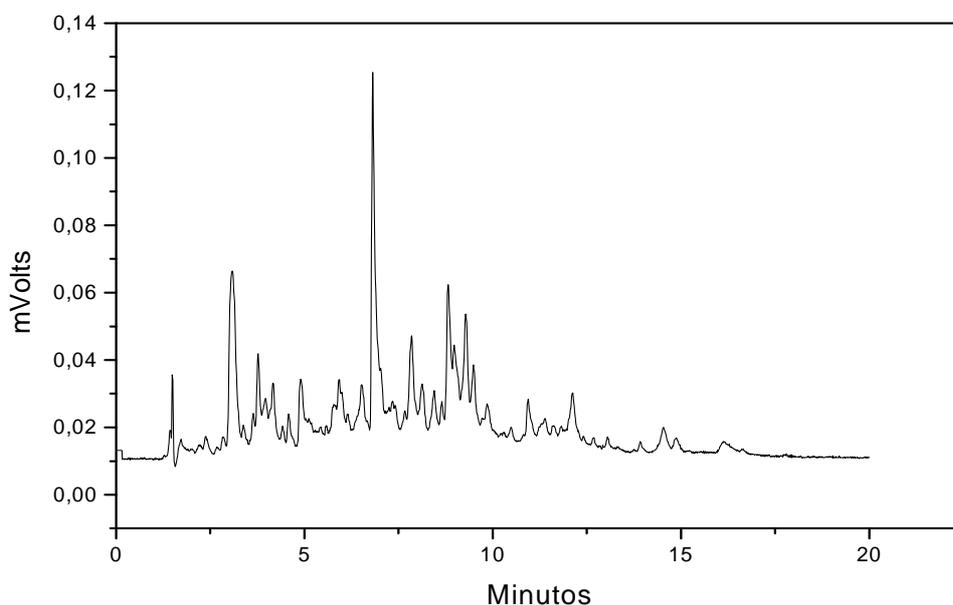


**Figura 19.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 1440 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina.

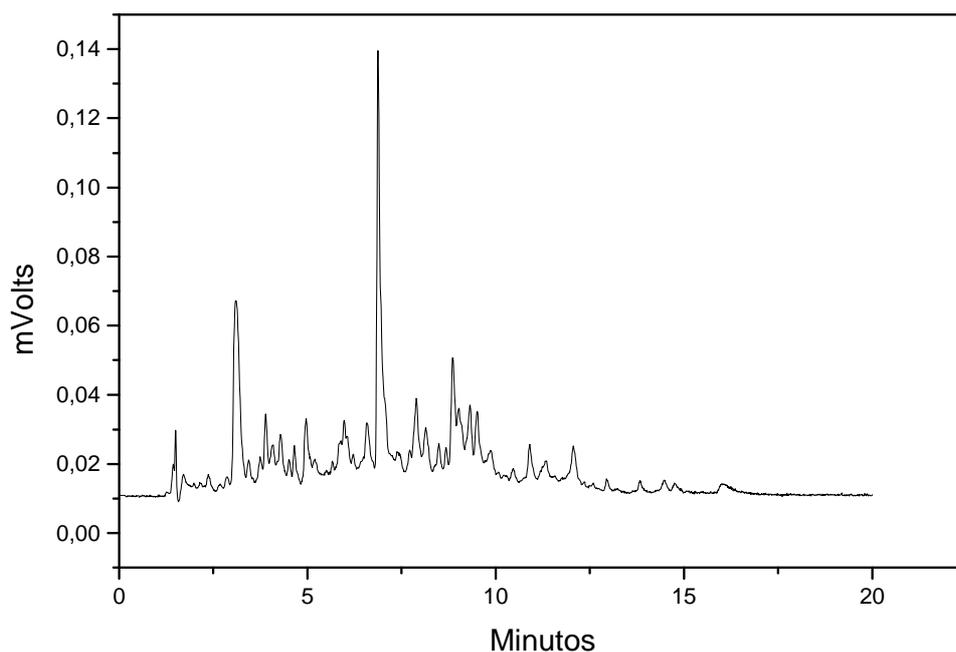
Resultados interessantes foram obtidos quando os ensaios enzimáticos foram realizados com as enzimas adicionadas separadamente em tempos diferentes de reação. Adicionou-se a alcalase no início da reação (tempo zero) e após 40 e 80 minutos de reação adicionou-se a tripsina e carboxipeptidase respectivamente.

O produto de hidrólise obtido neste tipo de experimento também foi analisado por CLAE (Figura 20.) revelando que houve diminuição da quantidade de peptídeos nessas amostras (valores de 0,007 e 0,130 mVolts para os dois picos de peptídeos) quando comparados com o perfil apresentado na Figura 18. (valores de 0,3 e 0,44 mVolts para os dois picos de peptídeos).

Experimentos semelhantes foram realizados utilizando agora as enzimas alcalase no início da reação, e tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase nos tempos 30, 60 e 90 minutos de reação. A análise em CLAE (Figura 21.) revelou diminuição da quantidade de peptídeos (valores de 0,07 e 0,14 mVolts para os picos maiores) quando comparados com os resultados apresentados na Figura 19 (valores de 0,4 e 0,55 mVolts para os picos maiores) onde as enzimas foram adicionadas juntas no início da reação. Estes resultados confirmam os apresentados anteriormente, comprovando desta forma que a hidrólise se torna mais eficiente quando as enzimas são adicionadas sequencialmente em diferentes tempos de reação.



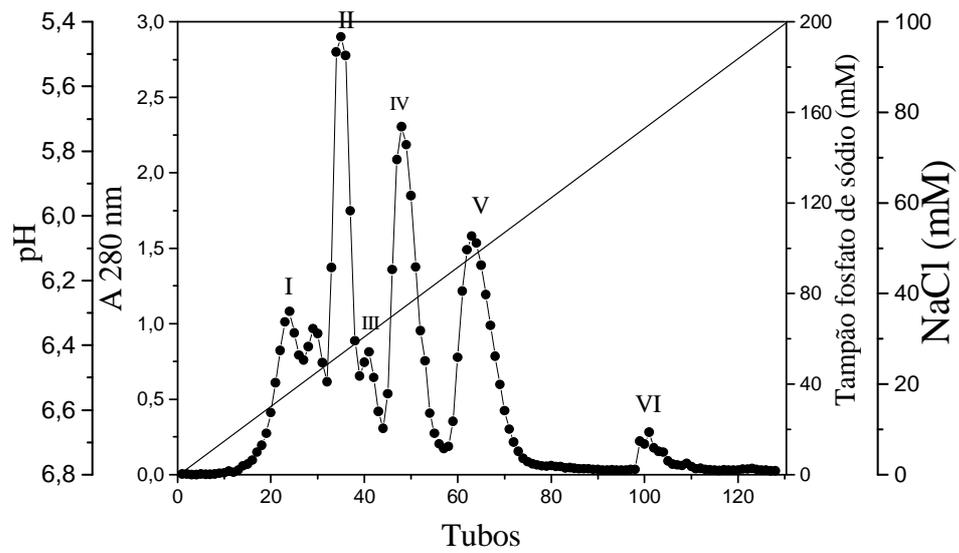
**Figura 20.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 120 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase adicionados nos tempos 0, 40 e 80 minutos de reação respectivamente.



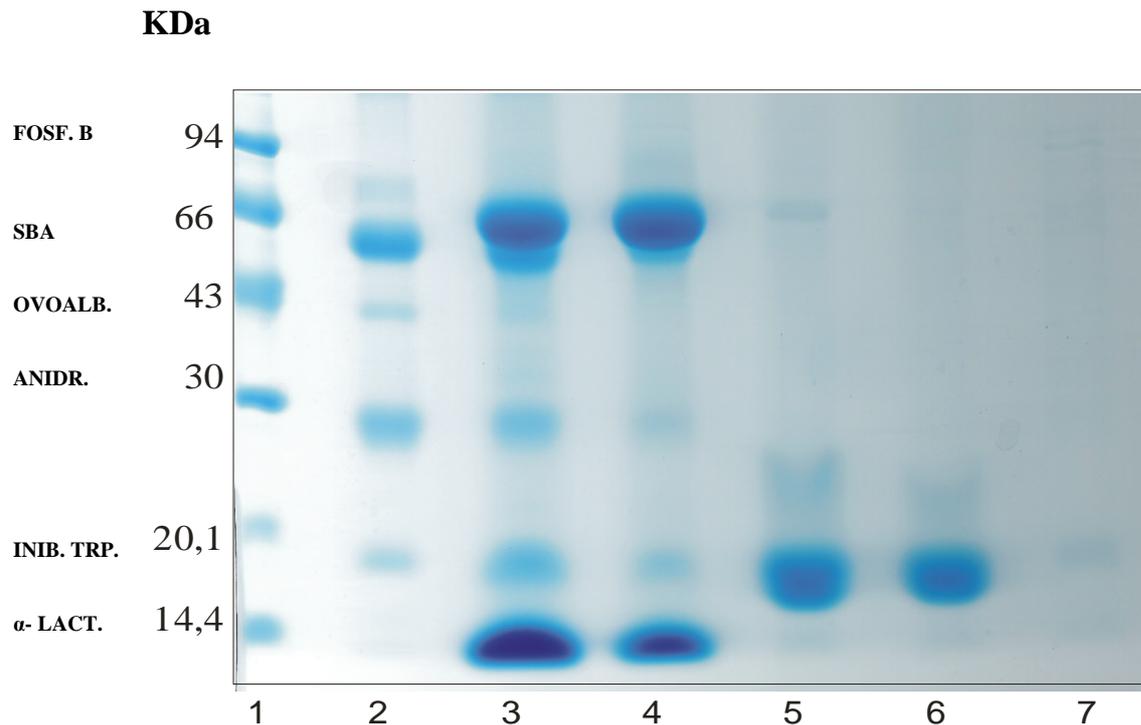
**Figura 21.** Análise por CLAE dos peptídeos presentes na amostra de 120 minutos do hidrolisado de soro de leite incubado com alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina adicionados nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos de reação respectivamente.

#### 4.7 Separação das proteínas do soro

Os resultados obtidos pela cromatografia, em que foi utilizada a conjugação de força iônica e pH no mesmo gradiente, são observados na Figura 22. O perfil das proteínas eluídas é mostrado na Figura 23. Na fração I a proteína predominante é a BSA, mas também podemos encontrar, em menor quantidade, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina. Nas frações II e III temos presentes a BSA,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina sendo que, na fração III a proteína  $\beta$ -lactoglobulina está quase ausente e a quantidade de  $\alpha$ -lactoalbumina é um pouco menor que na fração II. Na fração IV temos quase somente a  $\beta$ -lactoglobulina, porém, ainda encontramos pequena quantidade de BSA. Já na fração V encontramos somente a  $\beta$ -lactoglobulina. A fração VI não apresenta quantidades significantes de nenhuma proteína. A separação da  $\alpha$ -La e BSA pela cromatografia de exclusão molecular pode ser facilmente realizada, mantendo-se, deste modo, as propriedades nativas destas proteínas. Outras proteínas não identificadas presentes na amostra foram eluídas na fração I, II e III. James e Stanworth (1964) estudaram o fracionamento de proteínas séricas humanas por DEAE-Sephacel e obtiveram resultados similares.

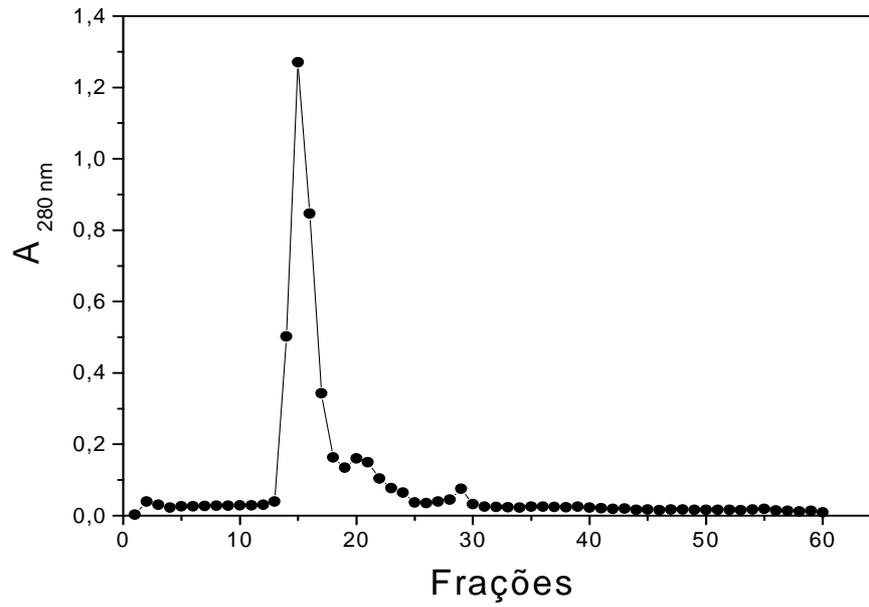


**Figura 22.** Perfil de eluição das proteínas do soro do leite bovino em DEAE Trisacryl (coluna de 1,4 x 23 cm). (•) Absorbância a 280nm; (-) gradiente de pH, NaCl e tampão concentrado. Frações (2,2 mL). **Fração I** (Tubos 21 a 26); **Fração II** (Tubos 33 a 38); **Fração III** (Tubos 40 a 43); **Fração IV** (Tubos 46 a 53); **Fração V** (Tubos 60 a 70); **Fração VI** (Tubos 99 a 103).

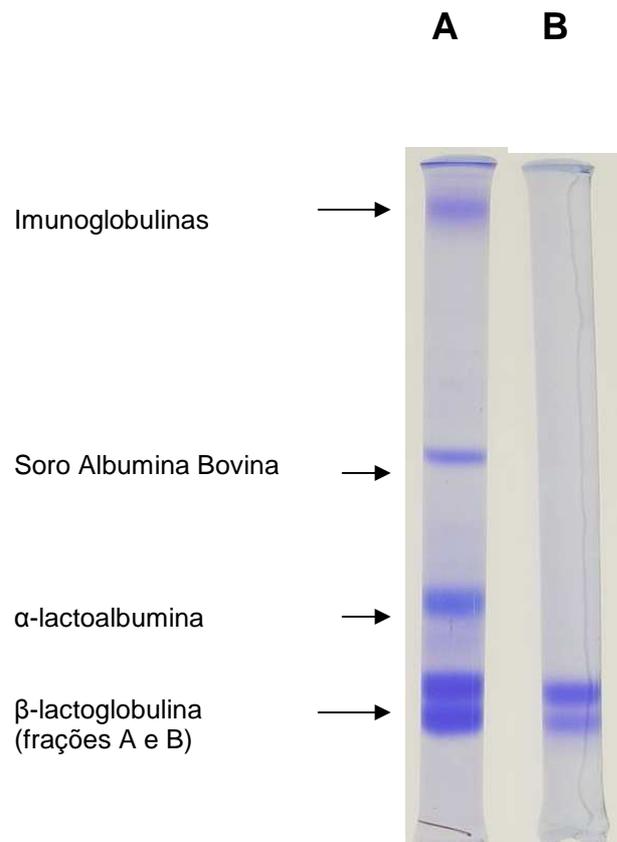


**Figura 23.** SDS-PAGE das frações eluídas da coluna cromatográfica de DEAE-Trisacryl. (1) Marcadores de massa molecular; (2) Fração I; (3) Fração II; (4) Fração III; (5) Fração IV; (6) Fração V; (7) Fração VI.

O procedimento inicial proposto (coluna de separação por DEAE-Trisacryl) de um modo geral obteve uma boa separação das proteínas do soro. Não foram necessários tratamentos especiais para alcançar este grau de eficiência. A filtração em Sephadex G-25 da fração V (Figuras 24 e 25), realizada após o procedimento de separação, também foi satisfatória para a purificação até homogeneidade da proteína  $\beta$ -lactoglobulina, conforme mostra a Figura 25. Alomirah e Alli (2004) também separaram a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La; porém, a metodologia utilizada se mostrou bem mais complexa do que a proposta neste trabalho. Maté e Krochta (1994) também desenvolveram um método de separação da  $\beta$ -lactoglobulina em larga escala; entretanto, foi utilizado um isolado protéico comercial e não soro in natura, como nesta Dissertação de mestrado.



**Figura 24.** Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25 (2 x 73 cm) da fração V obtida da coluna de DEAE-Trisacryl. (●) Absorbância em  $\lambda$  280nm.



**Figura 25.** PAGE 9% pH 8,9 de soro de leite (A) e da fração obtida da coluna de Sephadex G-25 (B).

# CONCLUSÃO

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho de dissertação de Mestrado permitem concluir que todas as combinações enzimáticas utilizando as seguintes enzimas proteolíticas: alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina hidrolisaram as proteínas do soro do leite. O acompanhamento por SDS-PAGE e CLAE do produto de hidrólise mostra que a melhor hidrólise foi obtida quando adicionou-se as quatro enzimas em diferentes intervalos de tempo de reação. Fica, portanto, estabelecido um processo de hidrólise destas proteínas, para possível aproveitamento de aminoácidos.

A cromatografia em DEAE-Trisacryl permitiu a purificação parcial das proteínas do soro do leite e, após filtração em Sephadex G-25, a purificação até homogeneidade da  $\beta$ -lactoglobulina. As frações não totalmente puras poderão ser purificadas por procedimentos cromatográficos adicionais como o realizado neste trabalho para a purificação de  $\beta$ -lactoglobulina. O método desenvolvido permite a separação das proteínas nas suas formas nativas, as quais poderão ser utilizadas em estudos nutricionais bem como em kits para determinação de massas moleculares em experimentos de bioquímica em laboratórios.

# ANEXOS

**6 ANEXO – TRABALHOS A SEREM PUBLICADOS**

## SEPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DO LEITE POR DEAE-TRISACRYL\*

Daniela Parreira MARQUES\*\*

Marcos Franqui CUSTÓDIO\*\*

Antonio José GOULART\*\*

Roberto de Campos GIORDANO\*\*\*

Raquel de Lima Campos GIORDANO\*\*\*

Rubens MONTI\*\*

**RESUMO:** O soro de leite, subproduto altamente protéico da indústria de laticínios, vem sendo descartado sem nenhum tratamento nos rios, provocando um alto impacto ambiental. No sentido de contribuir para a diminuição da poluição ambiental, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um procedimento simples para separar as proteínas do soro, sem alterar a conformação nativa das mesmas, para que, posteriormente, possam ser utilizadas na produção de dietas enterais, sucos, sorvetes, suplementos esportivos, kit para determinação de massa molecular em laboratórios, dentre outros produtos. O soro doce dialisado e filtrado em caulim teve a concentração de proteínas ( $6,67 \pm 0,04$  g/L) e lactose ( $44,90 \pm 0,02$  g/L) determinados e cromatografia de alta performance foi realizada utilizando-se uma coluna empacotada com DEAE-Trisacryl, combinando gradiente de força iônica e de pH na eluição, permitindo a separação parcial de soroalbumina bovina,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina. Os resultados mostraram que o procedimento de separação de proteínas proposto é um excelente método de separação, e tratamentos especiais não são necessários para obter este grau de eficiência. Após a separação, a  $\beta$ -lactoglobulina foi totalmente purificada através de cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-25.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cromatografia de troca iônica; filtração em gel; separação de proteínas; proteínas do soro do leite.

## Introdução

Estima-se que anualmente sejam produzidos 100 bilhões de litros de soro de leite pelas indústrias de laticínios.<sup>5</sup> Destes, 40% são descartados sem nenhum tratamento nos rios, causando sérios impactos ambientais.<sup>16</sup> O soro de leite contém quantidades significativas de lactose e proteínas. As principais proteínas são:  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg);  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -

\* Trabalho elaborado com apoio da FAPESP (Processo nº 98/11620-8) e PADCT/CNPq (Processo nº 620164/97-2).

\*\* Departamento de Alimentos e Nutrição. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – 14801-902 – Araraquara – SP, Brasil

\*\*\* Departamento de Engenharia Química – UFSCar – 13565-905 – São Carlos – SP, Brasil.

La); soro albumina bovina (BSA) e imunoglobulinas (Ig). A Tabela 1 mostra dados das propriedades dessas proteínas através das médias retiradas de diferentes fontes.<sup>16, 18</sup>

#### Tabela 1

O soro de leite também contém, em menor quantidade, outras proteínas e peptídeos com propriedades importantes. Fragmentos de  $\beta$ -caseína ou proteose-peptonas; resíduos de caseína coagulados; fragmentos de  $\kappa$ -caseína (glicomacropéptídeos, GMP), micelas de caseína, e complexos de fosfolipídeos e peptídeos não específicos também são encontrados. Existem diferentes aplicações para o soro de leite. As proteínas hidrolisadas podem ser utilizadas em suplementos alimentares ou pela indústria farmacêutica. A BSA é um exemplo de grande aplicação na bio-indústria e em laboratórios. Pesquisas têm sido efetuadas no sentido de demonstrar as aplicações para os concentrados de proteínas do soro e isolados de proteína do soro.<sup>10</sup> Algumas delas têm apontado outras possibilidades na utilização do soro de leite; como por exemplo sua utilização em culturas ou na produção de bebidas lácteas fermentadas.<sup>1, 17</sup> A hidrólise enzimática controlada das proteínas do soro utilizando tripsina e  $\alpha$ -quimotripsina foi recentemente estudada.<sup>6</sup> Diferentes procedimentos de cromatografia são utilizados industrialmente para separar e purificar as proteínas do soro.<sup>7, 8, 10, 12, 19</sup> Muitos deles utilizam vários passos para alcançar a separação completa o que acaba por elevar o custo do procedimento. O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de um procedimento simples e suave para separar as proteínas do soro de leite e a subsequente purificação de uma das proteínas.

#### **Material e métodos**

## **Material**

Soro de leite obtido em laboratório.

## **Métodos**

### **Obtenção do soro doce de leite**

Na preparação do soro no laboratório foi utilizado 0,6% v/v de renina animal, seguido da adição de 0,3% de solução de  $\text{CaCl}_2$  0,5M a 35°C. Após uma hora, os sólidos foram separados através de filtração simples com gaze. O soro resultante foi dialisado por 12 horas em membrana celulósica Trip-Fort (Hoechst) contra água destilada e filtrado em caulim (20g/L).

### **Determinação da concentração de proteína e lactose**

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree.<sup>9</sup> A proteína soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada na obtenção da curva padrão. O método de Miller<sup>15</sup> foi utilizado para determinar a quantidade de açúcar redutor (lactose) no soro.

### **Separação das proteínas por coluna de DEAE-Trisacryl**

O soro de leite dialisado e filtrado foi fracionado utilizando-se uma coluna DEAE-Trisacryl (Sigma) medindo 1,4 x 24 cm previamente equilibrada utilizando-se tampão fosfato de sódio 5 mM pH 6,8. A eluição foi realizada com fluxo de 27 mL/h, com frações de 2,2 mL coletadas em coletor FRAC-200 (Amersham Biosciences), combinando-se gradientes do mesmo tampão de 5 a 200 mM, NaCl de 0 a 100mM e de pH 6,8 a pH 5,6. A concentração protéica das frações foi determinada pela absorvância a 280nm em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences).

### **Análise de proteínas por SDS-PAGE**

O acompanhamento da separação das proteínas foi realizado por SDS-PAGE em gel 12%, de acordo com Laemmli<sup>13</sup>, e corado com Coomassie Brilliant Blue G Colloidal (Sigma). A massa molecular aparente foi determinado utilizando-se um kit Amersham Biosciences composto por fosforilase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -La (14,4 kDa).

### **Purificação de proteína através de coluna de gel Sephadex G-25**

Após a separação das proteínas e observação da eletroforese correspondente, a fração contendo  $\beta$ -lactoglobulina (fração V) foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em uma coluna de Sephadex G-25 medindo 2 x 73 cm. A essa coluna foram aplicados 2 mL da amostra inicialmente separada pela coluna de DEAE-Trisacryl. O fluxo foi de 30mL/h a 24°C. Frações de 2,2mL foram coletadas e analisadas através de PAGE. A eluição das proteínas foi analisada em  $\lambda$  280nm.

### **Análise de proteínas por PAGE**

A PAGE foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Davis<sup>4</sup> em pH 8.9 utilizando-se gel a 9%, tampão Tris-HCL e corrente de 2mA por tubo (0,5 x 8 cm). As proteínas de soro de leite foram aplicadas em volume de 50 $\mu$ L, com concentração de 74 $\mu$ g de proteína, respectivamente. Para a proteína purificada o volume foi de 25  $\mu$ L. O indicador de corrida empregado foi o azul de bromofenol. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue R 250 Sigma (método modificado por Bautista<sup>3</sup>).

## **Resultados e discussão**

### **Caracterização do soro**

As quantidades de lactose e proteína do soro preparado em laboratório foram comparadas com a literatura, e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. As diferenças observadas nas dosagens realizadas de proteína podem ser explicadas pelo fato de a lactose atuar como interferente no método utilizado. Após a realização da diálise e filtração os valores encontrados de proteína se aproximaram da literatura. A concentração de proteína determinada está um pouco acima dos valores citados em literatura, provavelmente devido à presença de fragmentos de caseína provenientes da hidrólise da caseína  $\kappa$ . A filtração em caulim mostrou-se eficiente na remoção destes fragmentos e possíveis micelas de caseína não hidrolisadas. Após este procedimento, os valores obtidos foram mais próximos aos reportados por Morr & Ha.<sup>16</sup>

Tabela 2

### **Separação das proteínas do soro**

Os resultados obtidos pela cromatografia, em que foi utilizada a conjugação de força iônica e pH no mesmo gradiente, são observados na Figura 1. O perfil das proteínas eluídas é mostrado na Figura 2. Na fração I a proteína predominante é a BSA mas, também podemos encontrar, em menor quantidade, a proteína  $\beta$ -lactoglobulina. Nas frações II e III temos presentes a BSA,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina sendo que, na fração III a proteína  $\beta$ -lactoglobulina está quase ausente e a quantidade de  $\alpha$ -lactoalbumina é um pouco menor que na fração II. Na fração IV temos quase somente a  $\beta$ -lactoglobulina porém, ainda encontramos pequena quantidade de BSA. Já na fração V encontramos somente a  $\beta$ -lactoglobulina. A fração VI não apresenta quantidades significantes de nenhuma proteína. A separação da  $\alpha$ -La

e BSA pela de cromatografia de exclusão molecular pode ser facilmente realizada, mantendo-se, deste modo, as propriedades nativas destas proteínas. Outras proteínas não identificadas presentes na amostra foram eluídas na fração I, II e III. James & Stanworth<sup>11</sup> estudaram o fracionamento de proteínas séricas humanas por DEAE-Sephacel e obtiveram resultados similares.

Figura 1

Figura 2

O procedimento inicial proposto (coluna de separação por DEAE- Trisacryl) de um modo geral obteve uma boa separação das proteínas do soro. Não foram necessários tratamentos especiais para alcançar este grau de eficiência. A filtração em Sephadex G-25 da fração V (Figura 3), realizada após o procedimento de separação, também foi satisfatória para a purificação até homogeneidade da proteína  $\beta$ -lactoglobulina, conforme mostra a Figura 4. Alomirah & Alli<sup>2</sup> também separaram a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La; porém, a metodologia utilizada se mostrou bem mais complexa do que a proposta neste trabalho. Maté & Krochta<sup>14</sup> também desenvolveram um método de separação da  $\beta$ -lactoglobulina em larga escala; entretanto, foi utilizado um isolado protéico comercial e não soro in natura, como neste trabalho.

Figura 3

Figura 4

## Conclusões

A cromatografia em DEAE-Trisacryl permitiu a purificação parcial das proteínas do soro do leite e, após filtração em Sephadex G-25, a purificação até homogeneidade da  $\beta$ -lactoglobulina. As frações não totalmente puras poderão ser purificadas por procedimentos cromatográficos adicionais como o realizado neste trabalho para a purificação de  $\beta$ -lactoglobulina. O método desenvolvido permite a separação das proteínas nas suas formas nativas, as quais poderão ser utilizadas em estudos nutricionais bem como em kits para determinação de massas moleculares em experimentos de bioquímica em laboratórios.

**Agradecimentos:** Agradecemos Francisco Carlos Rocatelli pelo suporte técnico.

MARQUES, D.P.; CUSTÓDIO, M.F.; GOULART, A.J.; GIORDANOR.C.; GIORDANO, R.L.C.; MONTI, R. Whey proteins separation by DEAE-Trisacryl. *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. , n. , p. , 2005.

- *ABSTRACT: Cheese whey, by-product from dairy industry that contains many proteins, has been discard without any treatment in rivers promoting many environmental impact. Aiming contribute to decrease the environmental pollution, the present work focuses on the development of a simple and mild procedure to fractionate the whey proteins so they can be used in the production of diets, juices, ice cream, sporting supplement and other products. Sweet whey dialyzed and filtrate in Kaolin had the protein ( $6,67\pm 0,04$  g/L) and lactose ( $44,90\pm 0,02$  g/L) concentrations were determined. A column packed with DEAE-Trisacryl used to separate the proteins, combining gradient of ionic strength and pH in the elution, allowed the partial separation of bovine soroalbumin,  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin. The results showed that the procedure proposed is an excellent separation*

*method, and special treatments were not necessary to obtain this efficiency degree. After the separation,  $\beta$ -lactoglobulina was purified to homogeneity through molecular exclusion chromatography in a column of Sephadex G-25.*

- KEYWORDS: Cheese whey proteins; gel filtration; ion exchange chromatography; protein separation.

### **Referências bibliográficas**

- 1 ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROCA, R. O. Physical and chemical characteristics of fermented dairy beverages using minas cheese whey. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.
- 2 ALOMIRAH, H.F.; ALLI, I. Separation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from whey and protein preparations. **Int. Dairy J.**, v.14, n.5, p.411-419, 2004.
- 3 BAUTISTA, A. Simply blue safe stain out performs the competition in protein staining. **Expressions**, v.10, n.4, p.6-7, 2003.
- 4 DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.121, p.404-427, 1964.
- 5 ALVES FILHO, M. **A nata do soro: proteína retirada de subproduto do leite reforça defesa do organismo.** Jornal Unicamp, Campinas, 2002. Disponível em: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/outubro2002/unihoje\\_ju194pag02.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2002/unihoje_ju194pag02.html). Acesso em: 09 set. 2003.
- 6 GALVÃO, C. M. et al. Controlled hydrolysis of cheese proteins using trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, p.761-776, 2001.
- 7 GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange of proteins from dairy whey. **J. Chromatogr. A**, v.808, p.141-151, 1998.
- 8 GONZÁLEZ-SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technol.**, v.57, p.1-11, 1996.

- 9 HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422-427, 1972.
- 10 IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.37, p.663-689, 1997.
- 11 JAMES, K.; STANWORTH, D. R. Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. I. The effect of the chemical and physical nature of the exchanger. **J. Chromatogr.**, v.15, p.324-335, 1964.
- 12 KONRAD, G.; LIESKE, B.; FABER, W. A large-scale isolation of native beta-lactoglobulin: characterization of physiochemical properties and comparison with other methods. **Int. Dairy J.**, v.10, p.713-721, 2000.
- 13 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- 14 MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M.  $\beta$ -Lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. **J. Food Sci.**, v.59, n.5, p.1111-1114, 1994.
- 15 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p. 426-428, 1959.
- 16 MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.33, p.431-476, 1993.
- 17 NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulation of whey-based media for xanthan gum production by *X. Campestris* C<sub>7</sub>L isolate. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v.21, n.1, p.82-85, 2001.
- 18 RICHARDS, N. S. P. S. Rational use of milk whey (Port.). **Indústria de Laticínios**, May/June, p.67-69, 1997.

19 ROSSANO, R.; D'ELIA, A.; RICCIO, P. One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxypatite-A flexible procedure suitable for small and medium scale preparations. **Protein Expres. Purif.**, v.21, p.165-169, 2001.

**Tabela 1.** Propriedades das proteínas do soro de leite.

<b>Proteínas</b>	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	BSA	Ig
Concentração no soro cru (g/L)	2-4	0,6-1,7	0,4	0,4-1,0
Conteúdo total de frações, % (m/m)	56-60	18-24	6-12	6-12
Massa Molecular (kDa)	18,3	14,4	66,0	$\geq$ 146
Ponto isoelétrico	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3

Fontes: Morr e Ha<sup>16</sup>; Richards.<sup>18</sup>

**Tabela 2.** Concentrações de lactose e proteínas determinados em soro de leite.

<b>Condições</b>	<b>Lactose (g/L)</b>	<b>Proteína (g/L)</b>
Soro produzido em laboratório*	36,80±0,60	14,71±0,35
Soro produzido em laboratório dialisado*	1,83±0,04	6,99±0,08
Soro produzido em laboratório dialisado e filtrado em caulim*	1,11±0,03	6,18±0,04
Morr e Ha <sup>16</sup>	46,00	6,15

\*os resultados são expressos em médias de triplicatas.

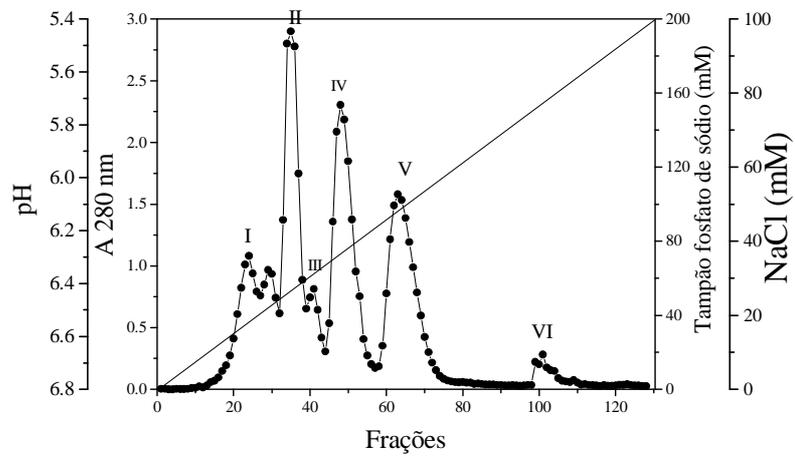


FIGURA 1. Perfil de eluição das proteínas do soro: coluna de 1,4 x 23 cm empacotada com DEAE-Trisacryl. (•) Absorbância a 280nm; (-) gradiente de pH, NaCl e tampão.

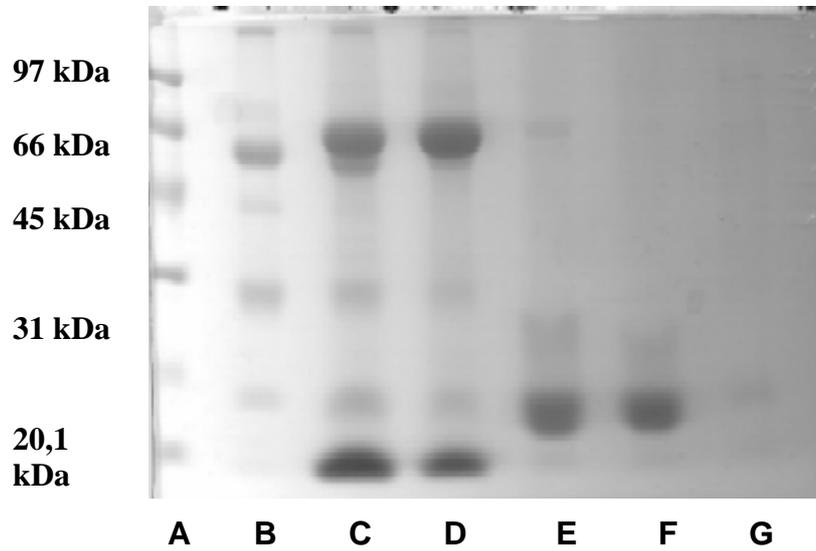


FIGURA 2. SDS-PAGE das frações eluídas da coluna cromatográfica de DEAE-Trisacryl. (A) Marcadores de massa molecular; (B) Fração I; (C) Fração II; (D) Fração III; (E) Fração IV; (F) Fração V; (G) Fração VI.

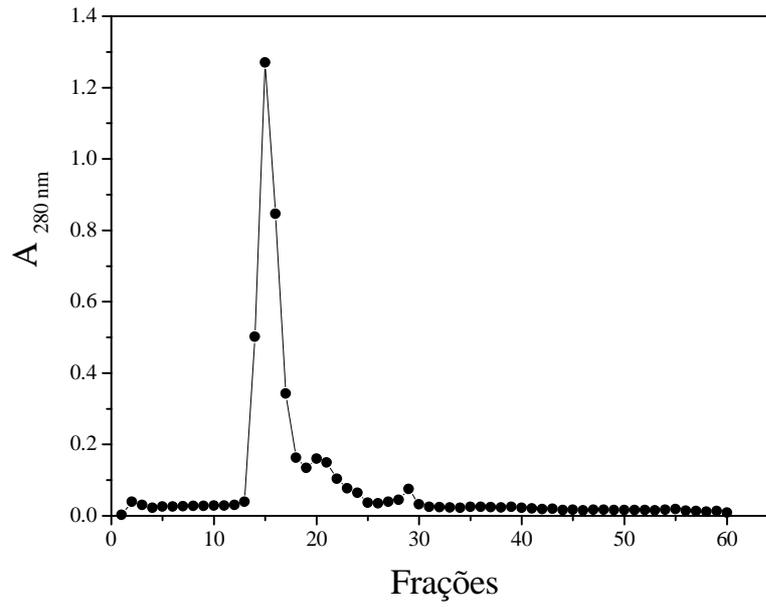


FIGURA 3. Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-25 (2 x 73 cm) da fração V obtida da coluna de DEAE-Trisacryl. (●) Absorbância em  $\lambda$  280nm.

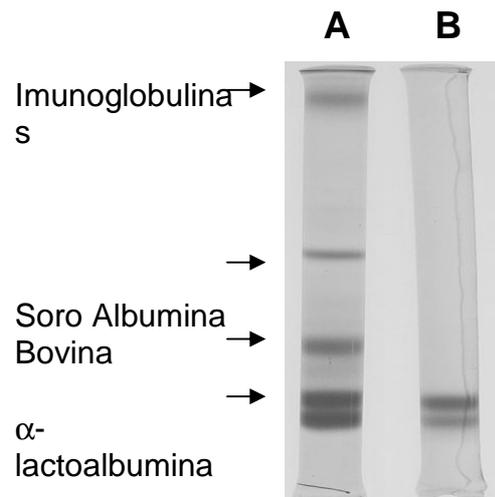


FIGURA 4. PAGE 9% pH 8,9 de soro de leite (A) e da fração obtida da coluna de Sephadex G-25 (B).

## **Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite com alcalase comercial de *Bacillus licheniformis* e combinações com tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase**

### **ABSTRACT**

Este trabalho relata estudos da hidrólise das proteínas do soro do leite por diferentes combinações com enzimas proteolíticas. O soro do leite foi caracterizado e vários estudos de hidrólise foram realizados utilizando suas proteínas como substrato e alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina como enzimas. Os resultados mostraram que a combinação enzimática mais eficaz na proteólise foi a realizada pelas quatro enzimas em conjunto (alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina). Uma melhora no grau de hidrólise e conseqüente diminuição dos picos de peptídeos observados na análise por CLAE, foram obtidas quando as enzimas foram adicionadas na mesma seqüência, porém, uma a uma em tempos diferentes durante a reação de hidrólise.

**Key word:** Hidrólise do soro de leite; alcalase, tripsina, carboxipeptidase, quimotripsina, proteínas, *Bacillus licheniformis*.

### **INTRODUÇÃO**

O soro do leite é considerado um subproduto de grande importância na indústria de laticínios, em razão da composição nutricional e do grande volume produzido. Representa 85- 95% do volume de leite (Galvão et al., 2001) e sua composição varia em função do queijo produzido. Em média, é constituído basicamente de 93% de água e somente 7% de matéria seca (parte sólida). Deste total, 71% corresponde à lactose, 10% à proteína bruta (PB), 12% à gordura e 11% aos sais minerais (Lizeire e Campos, 2000; Perea et al., 1993). As principais proteínas presentes no soro são  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, soro albumina bovina e imunoglobulinas. A hidrólise das proteínas do soro é uma das alternativas utilizadas para promover o reaproveitamento desse resíduo que retém cerca de 55% dos nutrientes existentes no leite (Stanton et al., 2002). Os hidrolisados de proteína têm sido utilizados para muitos propósitos como para melhorar ou modificar as propriedades funcionais dos produtos alimentícios, melhorarem as características nutricionais, retardar a deterioração, dar textura, aumentar ou diminuir a solubilidade, adicionar propriedades espumantes ou de coagulação, e melhorar a capacidade de emulsificação (Tardioli et al., 2003). As lactoalbuminas e

lactoglobulinas representam o maior valor agregado por quilo de soro e são apreciadas por serem proteínas balanceadas e de grande digestibilidade, utilizadas para a formulação de dietas especiais para bebês, pacientes convalescentes e para esportistas de alta performance (Perea e Ugalde, 1996). A hidrólise das proteínas do soro é realizada por enzimas proteolíticas. A alcalase é uma protease não específica do tipo serina produzida por uma cepa seleta de *Bacillus licheniformis* (Tardioli et al., 2003). Esta enzima cliva primariamente ligações peptídicas onde o lado carboxílico contém resíduos hidrofóbicos, como leucina, tirosina e valina (Adamson e Reynolds, 1996; Kukman, Blatnik e Abram, 1995). Atualmente, existem algumas fórmulas nutricionais que contém peptídeos, mas o tipo e a quantidade desses peptídeos dependem da fonte protéica (caseína, lactoalbumina, soja, carne) e do grau e tipo de hidrólise enzimática utilizada (Baró et al., 2001). O principal propósito desse trabalho foi hidrolisar as proteínas do soro de leite e observar o grau de hidrólise alcançado pela adição de diferentes combinações enzimáticas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Material***

O soro láctico foi preparado em laboratório. Alcalase proveniente de *B. licheniformis* adquirida da Merk. Tripsina e a Carboxipeptidase da Novo Nordisk e Quimotripsina da Sigma.

### ***Métodos***

#### **Produção do soro**

O soro foi produzido no laboratório a partir de leite C utilizando enzima renina (coalho comercial). Para a precipitação total das caseínas, foi adicionado  $\text{CaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A mistura foi mantida por uma hora em banho a  $35^\circ \text{C}$ . Após a coagulação, a massa foi cortada e dessorada. O soro obtido foi dialisado sob agitação constante, contra água destilada, para a retirada da lactose. Após a diálise, foi adicionado ao soro, caulim e então realizou-se a filtração em funil de Büchner de acordo com o procedimento descrito por Custódio, 2001. O soro dialisado e filtrado foi armazenado em frascos identificados, e congelado até o momento dos ensaios.

#### **Métodos analíticos**

A concentração de proteína existente no soro foi determinada pelo método de Lowry modificado por Hartree (1972). As leituras de absorvância foram feitas em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Biosciences) em  $\lambda$  660 nm usando, soro albumina bovina (Sigma) como padrão. A determinação de açúcar redutor (lactose), foi realizada seguindo-se o método de Miller, 1959. A leitura das absorvâncias foi feita em  $\lambda$  540 nm. A curva de calibração foi realizada com lactose (Sigma) como padrão.

### **Influência da temperatura e pH na atividade da alcalase**

Foram determinados concentração, temperatura ótima de hidrólise, pH ótimo de hidrólise e estabilidade da enzima alcalase. A temperatura ótima para a hidrólise das proteínas do soro pela alcalase foi determinada com a incubação de 10 mL soro de leite tratado, adicionado de 243  $\mu$ L de tampão em pH 9,5 e 12,5 $\mu$ L de enzima alcalase diluída cinco vezes em água milli-Q a diversas temperaturas. O pH ótimo dessa enzima foi determinado incubando 10 mL de soro e 12,5  $\mu$ L de enzima alcalase diluída cinco vezes a 55°C, com tampão padrão MClvaine (pH 2,0 a 8,0), tampão fosfato de Sörensen (pH 5,7 a 8,0) e tampão glicina-hidróxido de sódio (pH 8,6 a 10,6). Para o ensaio de estabilidade, diferentes concentrações da enzima foram incubadas com soro de leite em pH 9 a 55°C. Alíquotas de diversos intervalos de tempo de cada concentração foram retiradas para a análise quantitativa de peptídeos e aminoácidos pelo método de McDonald e Chen (1965).

### **Estudos cinéticos**

A atividade da alcalase foi determinada utilizando-se proteínas do soro do leite como substrato, pela quantificação do produto formado (aminoácidos e peptídeos) pelo método de McDonald e Chen (1965). Os valores das constantes  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  foram calculados a partir das velocidades iniciais, através da representação gráfica de Eadie-Hofstee.

### **Hidrólise enzimática com diferentes combinações de enzimas**

A hidrólise das proteínas do soro foi realizada inicialmente em três ensaios em pH 9,0 a 50°C pelas seguintes combinações enzimáticas: 1. alcalase e tripsina; 2. alcalase, tripsina e carboxipeptidase; e 3. alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina. As enzimas foram adicionadas juntas no tempo zero de reação a 30 mL de soro previamente tamponado a 50°C. Num segundo momento, com objetivo

de otimizar a força proteolítica das enzimas, mais dois ensaios foram realizados com as seguintes combinações enzimáticas: 4. alcalase, tripsina e carboxipeptidase; e 5. alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina. A alcalase foi a única enzima adicionada no tempo zero de reação. A tripsina foi adicionada ao ensaio com três combinações enzimáticas após 40 minutos de reação e ao ensaio com quatro combinações enzimáticas após 30 minutos de reação. A carboxipeptidase foi adicionada aos ensaios de três e quatro combinações enzimáticas nos tempos 80 e 60 minutos respectivamente, e a quimotripsina foi adicionada somente ao ensaio com quatro combinações enzimáticas após 90 minutos de reação. Amostras dos dois ensaios realizados neste segundo momento foram retiradas no tempo 120 minutos de reação e fervidas para a análise em CLAE.

### **Caracterização dos hidrolisados**

Para estimar o produto de reação liberado pelas proteinases, amostras obtidas nos tempos 60 e 1440 minutos foram analisadas pelo método de McDonald e Chen (1965).

### **SDS- PAGE**

A eletroforese desnaturante foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970) com tampão Tris-Glicina-SDS (pH 8,3) em gel 12%. Amostras das reações com diferentes combinações enzimáticas foram misturadas na proporção de 1:1 (vol/vol) com tampão Tris-glicerol  $\beta$ -ME e fervidas por 3 minutos a (100°C) anteriormente à aplicação no gel. Para visualizar as proteínas os géis foram corados com Brilliant Blue G-Colloidal através do método de Neuhoff (1988). Utilizou-se como padrão um kit de massa molecular da Amersham Biosciences constituído de fosforilase b (97 kDa); soro albumina bovina (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14,4 kDa).

### **Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

As amostras de produtos obtidos nos ensaios com as diferentes combinações enzimáticas foram fervidas por 3 minutos e congeladas para posterior aplicação em CLAE. Alíquotas de 20 $\mu$ L foram injetadas no cromatógrafo da marca Varian ProStar, composto por duas bombas modelo 210, injetor automático ProStar 400, detector UV/Visível modelo ProStar 320 e integrador Star, controlado por uma Workstation

para manipulação e tratamento dos dados. A coluna de separação utilizada foi a Nucleosil C<sub>18</sub> FR (25 x 0,4 cm),  $\Phi = 5\mu\text{m}$  com gradiente contínuo que consistia em 5-95% B (acetonitrila + TFA 0,045%) e uma mistura de água e acetonitrila 0,036% em 20 minutos. O pH inicial da reação foi de 4,5. Os dados gerados pela workstation foram tratados no Origin 5.0 para a realização dos gráficos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

### **Dosagem de proteína e açúcar redutor do soro**

O soro doce foi preparado no laboratório utilizando enzima renina (coalho) e 0.5% de CaCl<sub>2</sub> 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. Após a dessoração o soro foi submetido à diálise e em seguida à filtração em presença de caulin. Valores de  $6,07\pm 0,05$  mg/mL foram determinados para a proteína e valores de  $1,28\pm 0,04$   $\mu\text{mol/mL}$  foram determinados para açúcar redutor. Estes valores são coincidentes com os encontrados em literatura (Morr e Ha, 1993).

### **Influência da Concentração, Temperatura e pH ótimo de hidrólise para a enzima alcalase**

Diferentes concentrações da alcalase foram ensaiadas, utilizando soro de leite tratado como substrato. Após vários experimentos, a concentração ideal de enzima para obtenção de linearidade nas velocidades de reação foi de 37,5  $\mu\text{l}$  de enzima alcalse diluída cinco vezes para 30 mL de substrato. A temperatura e o pH ótimo de hidrólise obtidos foram 70°C e 9,0 a 9,5 respectivamente (Figuras 1 e 2). Para os demais ensaios enzimáticos realizados, foram utilizados a temperatura de 50°C e pH 9,0. De acordo com Custódio (2001), o pH e a temperatura ótimas das enzimas tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina encontram-se em 9,0 e entre 50°C e 60°C, respectivamente.

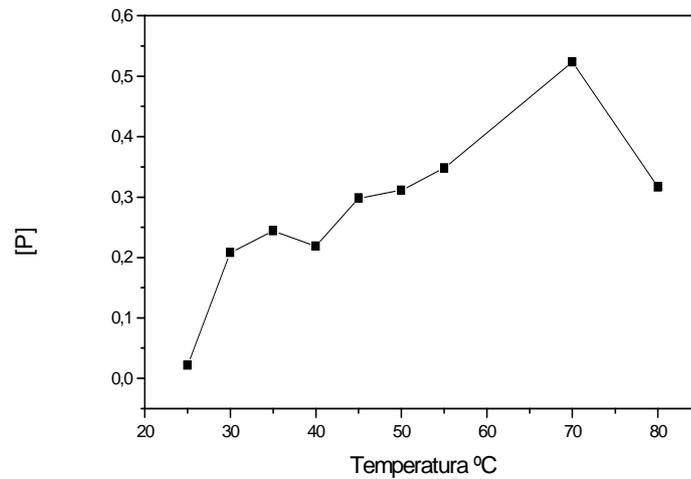


Figura 1. Determinação da temperatura ótima de hidrólise da enzima alcalase diluída cinco vezes incubada em pH 9,5 utilizando soro de leite tratado como substrato.

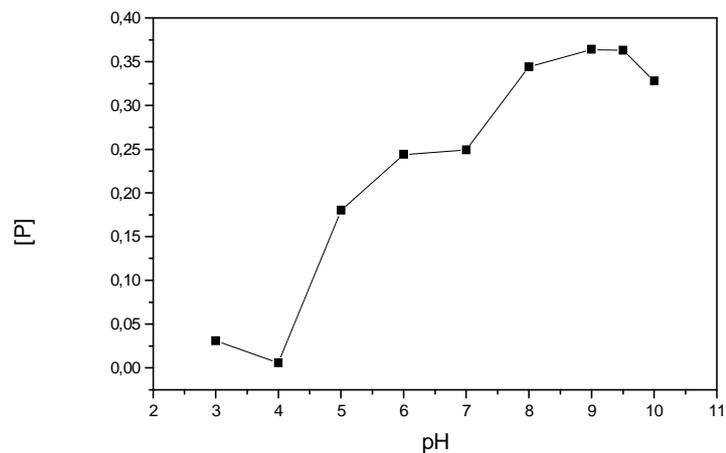


Figura 2. Determinação do pH ótimo de hidrólise da enzima alcalase diluída cinco vezes incubada a 55°C utilizando soro de leite tratado como substrato.

### Parâmetros cinéticos

K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> da enzima alcalase foram determinados através das velocidades iniciais em diferentes concentrações de substrato e utilizando a representação gráfica de Eadie-Hofstee (Figura 3). Foram determinados os valores de 3,3g.L<sup>-1</sup> e 0,66 μmol.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> para K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub>, respectivamente. Os resultados mostram que trata-se de uma enzima Michaeliana que possui boa afinidade pelo substrato. Os parâmetros cinéticos da tripsina e quimotripsina são apresentados a seguir de

acordo com Custódio (2001). Tripsina:  $2,388 \text{ g.L}^{-1}$  para  $K_m$  e  $0,231 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para  $V_{m\acute{a}x}$ ; Quimotripsina  $4,203 \text{ g.L}^{-1}$  para  $K_m$  e  $0,226 \text{ } \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$  para  $V_{m\acute{a}x}$ . Verificou-se que a  $V_{max}$  da alcalase é 2,86 vezes maior do que a  $V_{max}$  da tripsina, e 2,9 vezes maior do que a  $V_{max}$  da quimotripsina. Entretanto, a  $K_m$  da alcalase é 1,38 vezes maior que a  $K_m$  da tripsina, mas 1,27 vezes menor do que a  $K_m$  da quimotripsina.

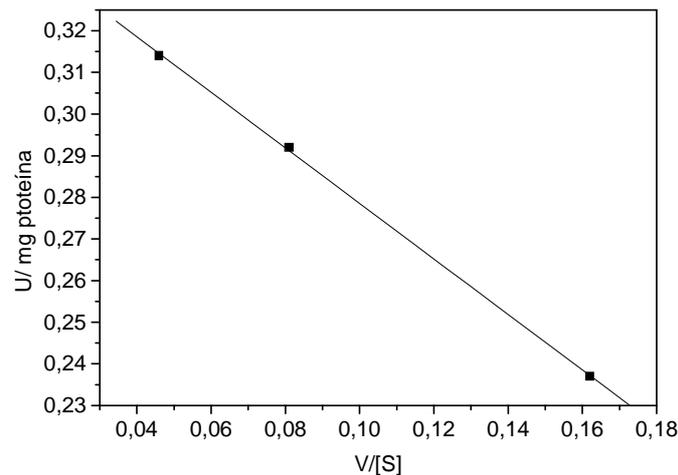


Figura 3. Parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  da enzima alcalase utilizando soro de leite tratado como substrato.

### **Quantificação do produto de reação liberado pelas proteinases**

Na Tabela 1 podemos observar que nos três ensaios realizados inicialmente, a quantidade em unidades totais de aminoácidos, expressa pelo valor em  $\mu\text{mol.mg}^{-1}$  de proteínas vezes o valor em proteínas totais das enzimas utilizadas em cada ensaio, aumentou quando comparados os tempos 60 e 1440 minutos de reação. Estes valores permitem concluir que há um aumento na hidrólise das proteínas do soro com o passar do tempo e que a amostra com maior quantidade de proteínas hidrolisadas deve ser a amostra retirada do terceiro ensaio. As unidades totais obtidas para o terceiro ensaio nos tempos de 60 e 1440 minutos foram iguais. É provável que no tempo de 60 minutos todas as proteínas que poderiam ser hidrolisadas pela combinação enzimática usada já tenham sido hidrolisadas.

Tabela 1. Quantificação do produto de hidrólise liberado pela reação com diferentes combinações enzimáticas utilizando soro de leite como substrato em pH 9,0 e temperatura 50°C.

Ensaio	U totais em 60 minutos de reação	U totais em 1440 minutos de reação
Soro + alcalase e tripsina	1,61	3,49
Soro + alcalase, tripsina e carboxipeptidase	1,40	4,01
Soro + alcalase, tripsina e quimotripsina	6,17	6,17

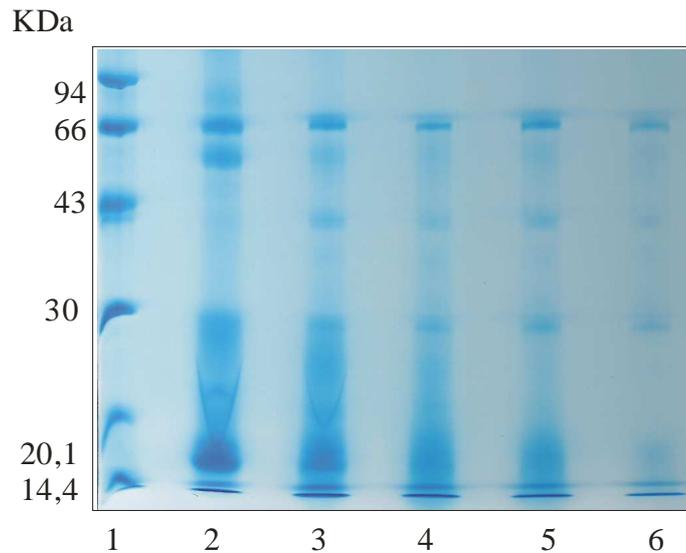
#### **Eletroforeses do produto de hidrólise obtido nos ensaios de diferentes combinações de enzima e soro de leite como substrato**

Análise eletroforética em SDS-PAGE do produto de hidrólise do ensaio com alcalase e tripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro de leite como substrato revelou que nas amostras retiradas no tempo zero (coluna 3) todas as proteínas do soro estão presentes, entretanto, nos tempos 10 e 30 minutos (colunas 5 e 6) observa-se que há uma diminuição das proteínas presentes no soro de leite (Figura 4). A Figura 5 mostra que amostras retiradas de ensaios com alcalase mais tripsina aos 60 minutos de reação (coluna 2) apresentam as proteínas  $\alpha$ -La e SBA, não hidrolisadas totalmente, enquanto que aos 1440 minutos (coluna 3), as proteínas SBA,  $\beta$ -Lg foram totalmente hidrolisadas, sobrando pequena fração de  $\alpha$ -La sem ser hidrolisada. Na mesma foram analisados também produtos de hidrólise da ação de três enzimas proteolíticas concomitantemente. Neste tipo de experimento verificou-se que não houve hidrólise maior do que quando se utilizou apenas duas enzimas. Aos 60 minutos (coluna 4) as proteínas SBA,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La não foram hidrolisadas, e aos 1440 minutos (coluna 5) a SBA,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La foram hidrolisadas parcialmente. A análise eletroforética do produto de hidrólise do ensaio da alcalase e tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0 e 50°C) utilizando o soro do leite como substrato (Figura 6) revela que com esta combinação de enzimas após 30 minutos de reação ocorreu hidrólise total da  $\beta$ -Lg e diminuição drástica da SBA e  $\alpha$ -La. Em estudos

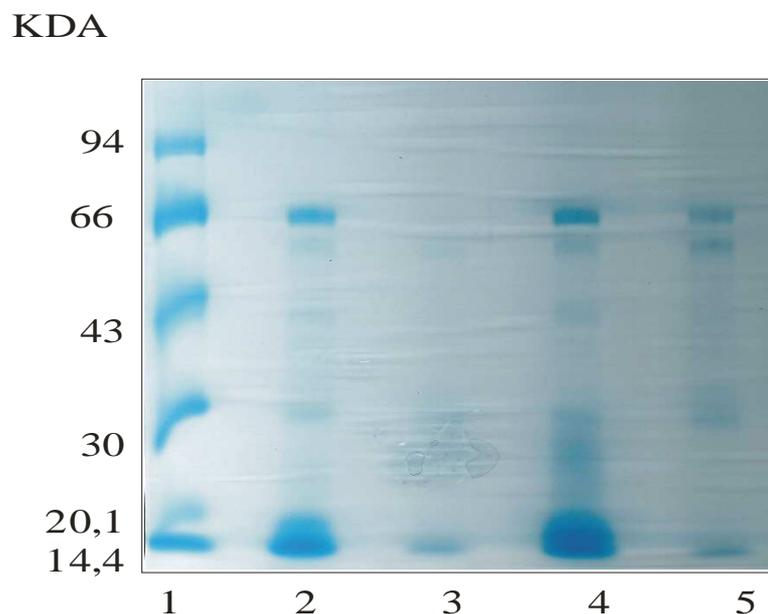
semelhantes utilizando agora o conjunto de quatro enzimas proteolíticas (alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina) ficou demonstrado que a hidrólise total das proteínas do soro do leite ocorre aos 1440 minutos de reação (coluna 7). Os resultados obtidos com as eletroforeses revelam que o tempo do ensaio enzimático e as diferentes combinações enzimáticas determinam as proteínas a serem hidrolisadas e também o grau de hidrólise (Figura 7).

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

A cromatografia líquida de alta eficiência de amostras dos produtos de hidrólise do soro de leite (1440 minutos) com as diferentes combinações proteolíticas (Figuras 8, 9 e 10) revelaram a presença de peptídeos, confirmando os resultados mostrados através das eletroforeses que as proteínas foram hidrolisadas. Os resultados apresentados na Figura 10 revelaram menor quantidade de peptídeos concordando com os resultados da maior hidrólise das proteínas verificados na SDS-PAGE (Figura 7) onde houve a combinação das quatro enzimas proteolíticas em estudo após 1140 minutos de reação enzimática. Resultados interessantes foram obtidos quando aos ensaios enzimáticos adicionou-se as enzimas em separado em tempos diferentes de reação. Adicionou-se a alcalase no início da reação (tempo zero) e após 40 e 80 minutos de reação adicionou-se a tripsina e carboxipeptidase, respectivamente. O produto de hidrólise obtido neste tipo de experimento também foi analisado por CLAE (Figura 11) revelando que houve diminuição da quantidade de peptídeos nessas amostras (valores de 0,007 e 0,130 mVolts para os peptídeos) quando comparados com o perfil apresentado na Figura 9 (valores de 0,3 e 0,44 mVolts para os dois peptídeos). Experimentos semelhantes foram realizados utilizando agora as enzimas alcalase no início da reação, seguida de tripsina, quimotripsina e carboxipeptidase nos tempos 30, 60 e 90 minutos de reação. A análise em CLAE (Figura 12) revelou diminuição da quantidade de peptídeos (valores de 0,07 e 0,14 mVolts para os picos maiores) quando comparados com os resultados apresentados na Figura 10 (valores de 0,4 e 0,55 mVolts para os picos maiores) onde as enzimas foram adicionadas juntas no início da reação. Estes resultados confirmam os apresentados anteriormente, comprovando desta forma que a hidrólise se torna melhor quando as enzimas são adicionadas sequencialmente em diferentes tempos de reação.

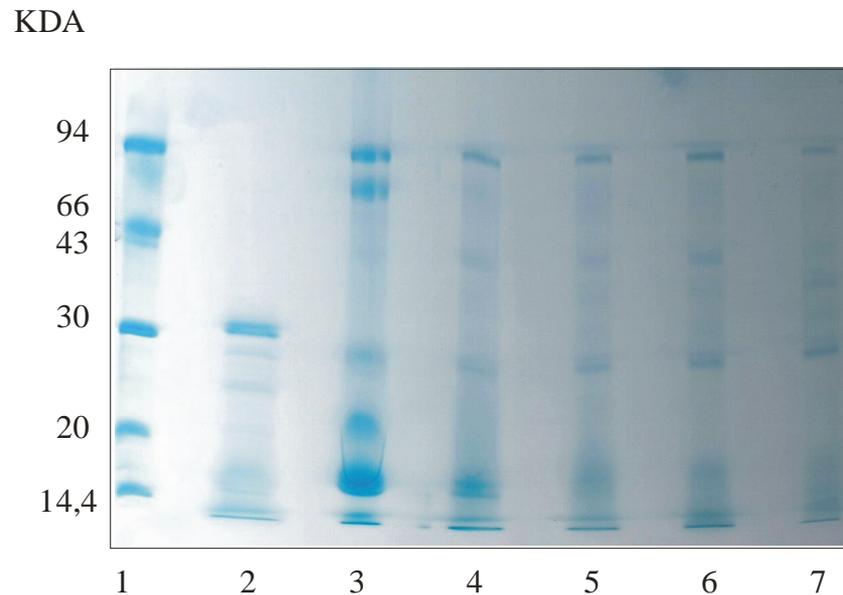


**Figura 4.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: soro de leite não hidrolisado; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 30 minutos de reação.

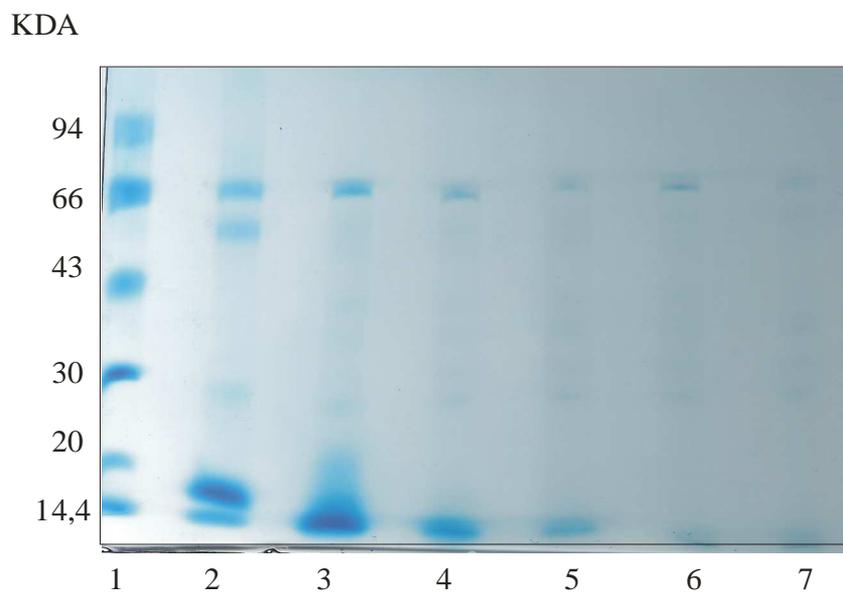


**Figura 5.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina e alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: hidrolisado com alcalase e tripsina 60 minutos; coluna 3: hidrolisado com alcalase e tripsina após 1440 minutos; coluna 4: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 60 minutos;

coluna 5: hidrolisado com alcalase, tripsina e carboxipeptidase após 1440 minutos de reação.

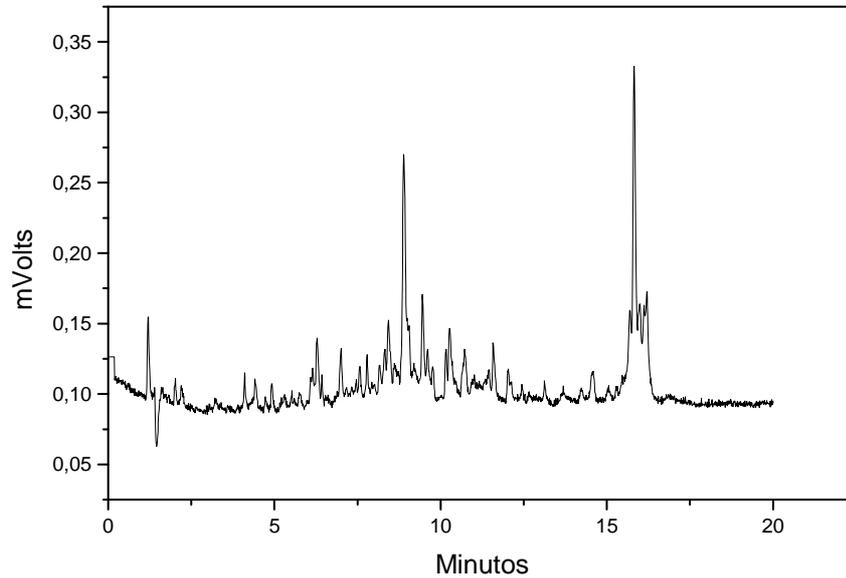


**Figura 6.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina e carboxipeptidase (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: enzima alcalase; coluna 3: tempo zero; coluna 4: 5 minutos; coluna 5: 10 minutos; coluna 6: 20 minutos; coluna 7: 30 minutos de reação.

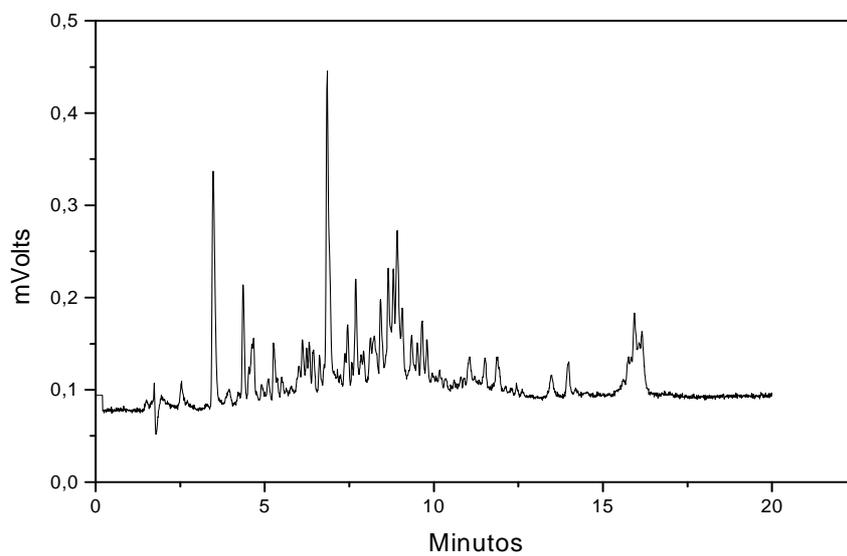


**Figura 7.** SDS- PAGE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina (pH 9,0, 50°C) utilizando soro do leite como substrato. Coluna 1: Marcador de massa molecular; coluna 2: tempo zero; coluna 3: 10 minutos; coluna 4:

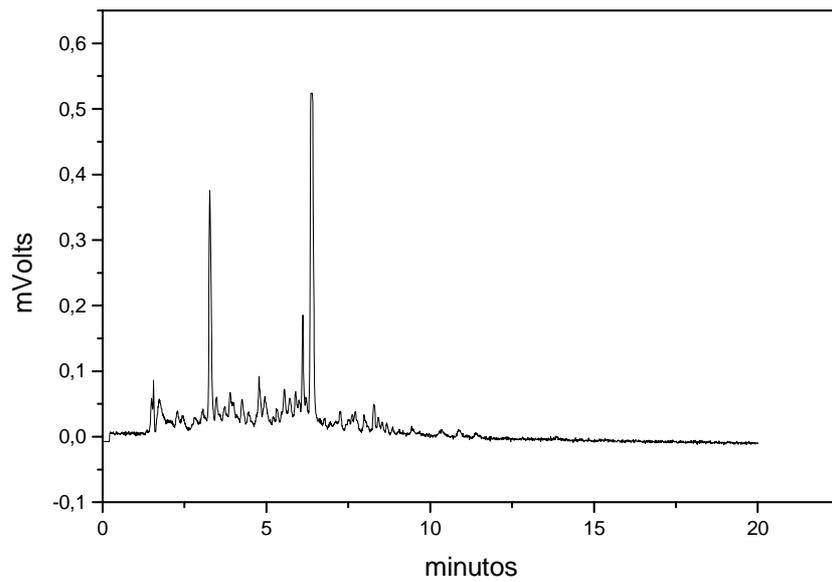
20 minutos; coluna 5: 30 minutos; coluna 6: 60 minutos; coluna 7: 1440 minutos de reação.



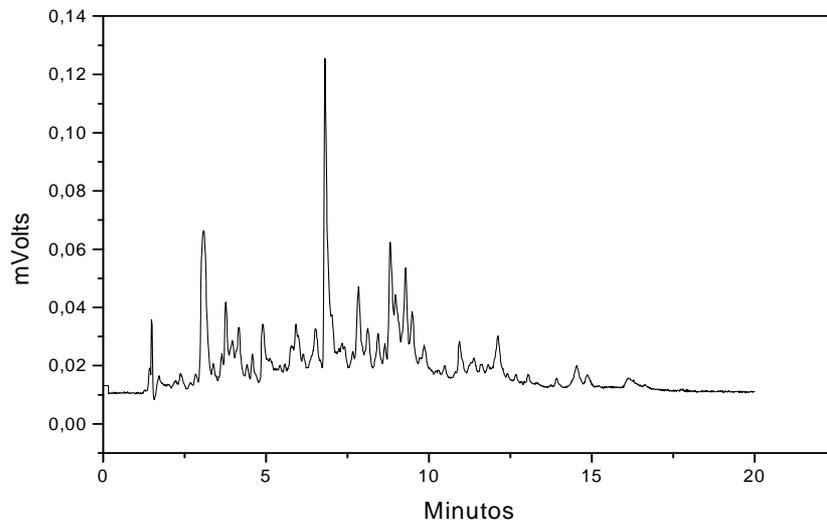
**Figura 8.** CLAE do produto de hidrólise da alcalase e tripsina utilizando o soro de leite como substrato por 1440 minutos.



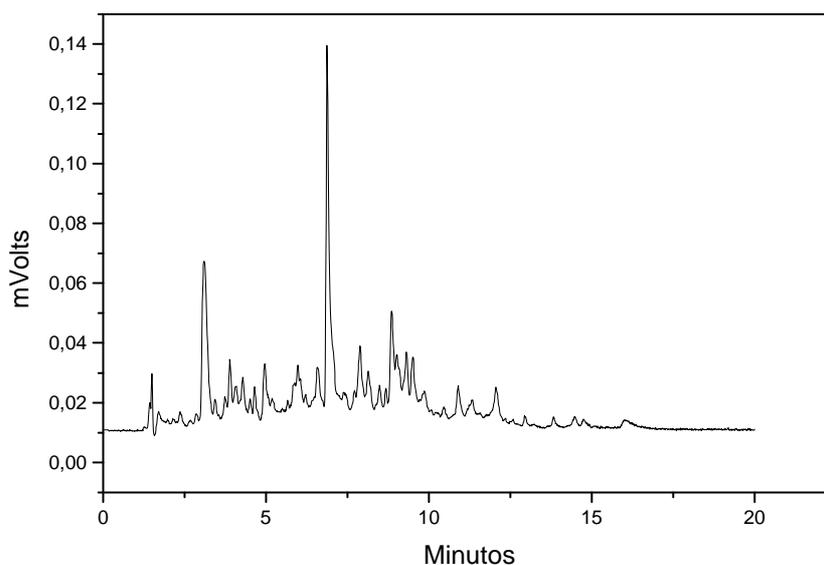
**Figura 9.** CLAE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina e carboxipeptidase utilizando o soro de leite como substrato por 1440 minutos.



**Figura 10.** CLAE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina utilizando o soro de leite como substrato por 1440 minutos.



**Figura 11.** CLAE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina e carboxipeptidase utilizando o soro de leite como substrato por 120 minutos.



**Figura 12.** CLAE do produto de hidrólise da alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina utilizando o soro de leite como substrato por 120 minutos.

## CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho permitem concluir que todas as combinações enzimáticas utilizando as seguintes enzimas proteolíticas: alcalase, tripsina, carboxipeptidase e quimotripsina hidrolisaram as proteínas do soro do leite. O acompanhamento por SDS- PAGE e CLAE do produto de hidrólise mostra que a melhor hidrólise foi obtida quando utilizaram-se as quatro enzimas adicionadas em diferentes intervalos de tempo de reação. Fica, portanto, estabelecido um processo de hidrólise destas proteínas, para possível aproveitamento de aminoácidos.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup>GALVÃO, C.M.A. et al. Controlled hidrolisis of cheese whey proteins using trypsin and  $\alpha$ - chymotripsin. **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, Araraquara, v.91-93, p.761- 776, 2001.
- <sup>2</sup>LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O.F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite.**, Rio, p.46, 2000. Disponível em: < <http://www.cnpqi.embrapa.br/pastprod/textos/folha46.html>.> Acesso em: 04 set. 2003.

- <sup>3</sup>PEREA, A. et al. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme Microb. Technol.**, Spain, v. 15, p. 418- 423, 1993.
- <sup>4</sup>TARDIOLI, P.W. et al. Design of New Immobilized- Stabilized Carboxipeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 565- 574, 2003.
- <sup>5</sup>STANTON, C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O'CONNOR, P. Development of technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002. Disponível em: < [www.tegasc.ie/research/reports/dairyproduction/4216/eopr-4216.htm](http://www.tegasc.ie/research/reports/dairyproduction/4216/eopr-4216.htm).> Acesso em: 04 set. 2003.
- <sup>6</sup>PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology.**, Spain, n.18, p. 29- 34, 1996.
- <sup>7</sup>TARDIOLI, P.W. et al. Hydrolysis of proteins by Immobilized stabilized Alcalase-Glyoxil Agarose. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 352- 360, 2003.
- <sup>8</sup>ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E.C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology.**, Australia, n.19, p. 202- 207, 1996.
- <sup>9</sup>KUKMAN, I. L.; ZELENIK- BLATNIK, M.; ABRAM, V. Isolation of low- molecular-mass hydrophobic bitter peptides in soybeanprotein hydrolysates by reversed- phase high- performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, n. 704, p.113- 120, 1995.
- <sup>10</sup>BARÓ, L.; JIMÉNEZ, J.; MARTÍNEZ- FÉREZ, A.; BOUZA, J.J. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars Pharmaceutica.**, Granada, v. 42, n.3- 4, p.135- 145, 2001.
- <sup>11</sup>CUSTÓDIO, M.F. **Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura.** 2001. 77p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- <sup>12</sup>HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry.**, England, v.48, p.422-427, 1972.
- <sup>13</sup>MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Biochemistry.**, v.31, p.426-428, 1959.

- <sup>14</sup>MCDONALD, C.E.; CHEN, L.L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. **Anal. Biochemistry.**, v.10, p.175-177, 1965.
- <sup>15</sup>LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature.**, v.227, p.680-685, 1970.
- <sup>16</sup>NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. **Electrophoresis.**, v. 9, p. 255- 256, 1988.
- <sup>17</sup>MORR, C.V.; HA, E. Y. W. Crit. Rev. **Food Sci Nutr.**, v. 33, p. 431- 476, 1993.
- <sup>18</sup>SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal.**, Ireland, v. 13, p.447- 453, 2003.
- <sup>19</sup>OTTE, J. et al. Hydrolysis of Bovine  $\beta$ - Lactoglobulin by Various Proteases and Identification of Selected Peptides. **Int. Dairy Journal.**, Denmark, n. 7, p. 835- 848, 1997)
- <sup>20</sup>KANANEN, A. et al. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal.**, Finland, n. 10, p. 691- 697, 2000.
- <sup>21</sup>BLOCK, J. D.; MERCHERS, M.; RENTERGHEM, R. V. Capillary Electrophoresis of the Whey Protein Fraction of Milk Powders for Monitoring Storage Conditions. **Int. Dairy Journal.**, Belgium, n. 8, p. 787- 792, 1999.
- <sup>22</sup>FAN, X. et al. New Reagents for Determination of amino acids by liquid chromatography with pre- column fluorescence derivatization. **Analytica Chimica Acta.**, China, n. 367, p. 81- 91, 1998.

# *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, N. J.; REYNOLDS, E.C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. **Enzyme and Microbial Technology.**, Australia, n.19, p. 202- 207, 1996.
- ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROCA, R. O. Physical and chemical characteristics of fermented dairy beverages using minas cheese whey. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.
- ALOMIRAH, H.F.; ALLI, I. Separation and characterization of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin from whey and protein preparations. **Int. Dairy J.**, v.14, n.5, p.411-419, 2004.
- ALVES FILHO, M. **A nata do soro: proteína retirada de subproduto do leite reforça defesa do organismo.** Jornal Unicamp, Campinas, 2002. Disponível em: [http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp\\_hoje/ju/outubro2002/unihoje\\_ju194pag02.html](http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2002/unihoje_ju194pag02.html). Acesso em: 09 set. 2003.
- BARÓ, L. et al. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. **Ars Pharmaceutica.**, Granada, v. 42, n.3-4, p.135- 145, 2001.
- BAUTISTA, A. Simply blue safe stain out performs the competition in protein staining. **Expressions**, v.10, n.4, p.6-7, 2003.
- BLOCK, J. D.; MERCHERS, M.; RENTERGHEM, R. V. Capillary Electrophoresis of the Whey Protein Fraction of Milk Powders for Monitoring Storage Conditions. **Int. Dairy Journal.**, Belgium, n. 8, p. 787- 792, 1999.
- BLOCK, J. D. et al. Monitoring nutritional quality of milk powders: capillary electrophoresis of the whey protein fraction compared with other methods. **International Dairy Journal.**, Belgium, v.13, p. 87- 94, 2003.
- CORSI, M. K.; SILVA, C.R.N.; GIORDANO, R.C. **Análise de processo de recuperação de soro de queijo através da produção controlada de hidrolisado protéico.** 1999. Trabalho de Iniciação Científica- Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- CUSTÓDIO, M.F. **Hidrólise enzimática das proteínas do soro do leite: caracterização cinética e condições ótimas de pH e temperatura.** 2001. 77p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.121, p.404-427, 1964.
- FAN, X. et al. New Reagents for Determination of amino acids by liquid chromatography with pre- column fluorescence derivatization. **Analytica Chimica Acta.**, China, n. 367, p. 81- 91, 1998.
- FUENTE, M. A; et al. Process- induced changes in whey proteins during the manufacture of whey proteins concentrate. **International dairy Journal.**, New Zeland, v. 12, p.361-369, 2002.
- FURTADO, M.A.M. et al. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.25, n.3, p.625-639, maio/jun.,2001.
- GALVÃO, C. M. et al. Controlled hydrolysis of cheese proteins using trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, p.761-776, 2001.
- GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Functional and biological properties obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins. **American Dairy Science Association.**, Canada, v. 86, p.78- 87, 2003.
- GERBERDING, S. J.; BYERS, C. H. Preparative ion-exchange of proteins from dairy whey. **J. Chromatogr. A**, v.808, p.141-151, 1998. GONZÁLEZ- TELLO, P. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins.I. Kinetic Models. **Biotechnology and Bioengineering.**, v.44, p.523-528, 1994.

- GONZÁLEZ- TELLO, P. et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins.II. Molecular-Weight Range. **Biotechnology and Bioengineering.**, v.44, p.529-532, 1994.
- GONZÁLEZ-SISO, M. I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technol.**, v.57, p.1-11, 1996.
- GUADIX, A. et al. Processos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. **Ars Pharmaceutica.**, Granada, v. 41, n. 1, p. 79- 89, 2000.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v.48, p.422-427, 1972.
- HAVEA, P. et al. Electrophoretic characterization of the protein products formed during heat treatment of whey protein concentrate solutions. **Journal of Dairy Research.**, v.65, p.79-91, 1998.
- HINRICHS, J. Incorporation of whey proteins in cheese. **International Dairy Journal.**, Germany, v. 11, p.495- 503, 2001.
- IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N.Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.37, p.663-689, 1997.
- INNOCENTE, N. et al. Emulsifying properties of the total fraction and the hydrophobic fraction of bovine milk proteose- peptones.**Int. Dairy Journal.**, Belgium, v. 8, p.981- 985, 1998.
- JAMES, K.; STANWORTH, D. R. Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. I. The effect of the chemical and physical nature of the exchanger. **J. Chromatogr.**, v.15, p.324-335, 1964.
- JANSON, J. C.; RYDÉN, L. **Protein Purification.** United States of America, VHC, 1989. 502p.
- JÚNIOR, R. S. **Inteligência computacional aplicada à automação da hidrólise enzimática de soro de queijo em reator contínuo.** 2003. 162p. Tese (Doutorado)- Departamento de Engenharia Bioquímica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- KANANEN, A. et al. Influence of chemical modification of whey protein conformation on hydrolysis with pepsin and trypsin. **International Dairy Journal.**, Finland, n. 10, p. 691-697, 2000.
- KONRAD, G.; LIESKE, B.; FABER, W. A large-scale isolation of native beta-lactoglobulin: characterization of physiochemical properties and comparison with other methods. **Int. Dairy J.**, v.10, p.713-721, 2000.
- KOSIKOWSKI, F.U. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science.**, v.62,p.1149-1160, 1979.
- KOSIKOWSKI, F.U. Greater utilization of whey powder for human consumption and nutrition. **Journal of Dairy Science.**, v.50, n.8, p.1343-1345, 1967.
- KUKMAN, I. L.; ZELENIK- BLATNIK, M.; ABRAM, V. Isolation of low- molecular- mass hydrofobic bitter peptides in soybeanprotein hydrolysates by reversed- phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, n. 704, p.113- 120, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LIESKE, B.; KONRAD, G. Interrelation between pH and availability of  $\alpha$ - lactalbumin and  $\beta$ - Lactoglobulin for proteolysis by papain. **Int. Dairy Journal.**, Germany, v. 6, p.359- 370, 1996.
- LIZIEIRE, R.S.; CAMPOS, O.F. Soro de queijo “in natura” na alimentação do gado de leite. **Embrapa gado de leite.**, Rio, p.46, 2000. Disponível em: < <http://www.cnp.gl.embrapa.br/pastprod/textos/folha46.html>.> Acesso em: 04 set. 2003.
- LOURENÇO, E. J. Tópicos de proteínas de Alimentos. **Proteínas do leite bovino.** Jaboticabal: Funep, 2000. p.179- 231.

- MCDONALD, C.E.; CHEN, L.L. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. **Anal. Biochemistry.**, v.10, p.175-177, 1965.
- MATÉ, J.I.; KROCHTA, J.M.  $\alpha$ -Lactoglobulin separation from whey protein isolate on a large scale. **J. Food Sci.**, v.59, n.5, p.1111-1114, 1994.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p. 426-428, 1959.
- MONTI, J.C.; JOST, R. Solubilization of cheese whey protein by tripsin and a process to recover the active enzyme from digest. **Biotechnology and Bioengineering.**, v.20, p.1173-1185, 1978.
- MONTI, J.C.; JOST, R. Emulgateurs peptidiques obtenus par l'hydrolyse enzymatic partielle de la protéine sérique du lait. **La Lait.**, v.62, p.521-530, 1982.
- MONTI, R.; BASILIO, C.A.; TREVISAN, H.C.; CONTIERO, J. Purification of papain from fresh látex of *Carica papaya*. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, Araraquara, v.43, n.5, p.01-507, 2000.
- MORR, C.V. Functional characteristics of whey protein concentrates. **Journal of Food Science.**, v.20, p.1173-1185, 1978.
- MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Crit. Rev. Food Sci.**, v.33, p.431-476, 1993.
- NEUHOFF, V.; STAMM, R.; EIBL, H. **Electrophoresis.**, v. 9, p. 255- 256, 1988.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulation of whey-based media for xanthan gum production by *X. Campestris* C<sub>7</sub>L isolate. **Cienc. Tecnol. Alim.**, v.21, n.1, p.82-85, 2001.
- OTTE, J. et al. Hydrolysis of Bovine  $\beta$ - Lactoglobulin by Various Proteases and Identification of Selected Peptides. **Int. Dairy Journal.**, Denmark, n. 7, p. 835- 848, 1997.
- PEREA, A. et al. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. **Enzyme Microb. Technol.**, Spain, v. 15, p. 418-423, 1993.
- PEREA, A.; UGALDE, U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. **Enzyme and Microbial Technology.**, Spain, n.18, p. 29- 34, 1996.
- RICHARDS, N. S. P. S. Rational use of milk whey (Port.). **Indústria de Laticínios**, May/June, p.67-69, 1997.
- PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, Farr and randall. **Analytical biochemistry.**, v.100, p.201-220, 1979.
- RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo- Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Rev. Food Ingredientes.**, Rio Grande do Sul, v.17, p.20-27, mar/abr. 2002.
- ROSSANO, R.; D'ELIA, A.; RICCIO, P. One-step separation from lactose: recovery and purification of major cheese-whey proteins by hydroxyapatite-A flexible procedure suitable for small and medium scale preparations. **Protein Express. Purif.**, v.21, p.165-169, 2001.
- SCOPES, K. R. **Protein Purification.** 3 ed. New York: Springer, 1994. 380p.
- SMYTH, M.; FITZGERALD, R. J. Characterization of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination. **Int. Dairy Journal.**, Ireland, v. 7, p.571-577, 1997.
- SOUZA, E.M.T. et al. Electrophoretic analysis to detect and quantify whey in milk and dairy beverages. **Ciência e tecnologia de Alimentos.**, Campinas, v. 20, n. 3, p. 1-9, 2000.
- SPELLMAN, D. et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. **International Dairy Journal.**, Ireland, v. 13, p.447- 453, 2003.
- STANTON, C.; FITZGERALD, R.J.; DONNELLY, W.J.; O'CONNOR, P. Development of technologies for separation and functional improvement of individual milk protein fractions. **The Dairy Products Research Centre.**, Moorepark, Fermoy, 2002. Disponível em: <

[www.tegasc.ie/research/reports/dairyproduction/4216/eopr-4216.htm](http://www.tegasc.ie/research/reports/dairyproduction/4216/eopr-4216.htm).> Acesso em: 04 set. 2003.

TARDIOLI, P.W. et al. Design of New Immobilized- Stabilized Carboxipeptidase A Derivative for Production of Aromatic Free Hydrolysates of Proteins. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 565- 574, 2003

ZALL, R.R. Whey treatment and utilization. In: GREEN, J.H. **Food Processing Waste Management.**, Westport, p.175-201, 1979.

TARDIOLI, P.W. et al. Hydrolysis of proteins by Immobilized stabilized Alcalase- Glyoxil Agarose. **Biotechnol. Prog.**, Madrid, n. 19, p. 352- 360, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)